



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE  
OVULAÇÃO EM VACAS DA RAÇA FRÍSLIA HOLSTEIN - OVSYNCH E DOUBLESYNCH

MARLENE ALMEIDA RAPOSO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa  
Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus  
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

2013

LISBOA

---



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE  
OVULAÇÃO EM VACAS DA RAÇA FRÍSLIA HOLSTEIN – OVSYNCH E DOUBLESYNCH

MARLENE ALMEIDA RAPOSO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa  
Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus  
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

2013

LISBOA

---

**“O Futuro pertence àqueles que acreditam  
na Beleza de seus Sonhos”**

**Eleanor Roosevelt**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao terminar este trabalho desejo agradecer a todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a sua realização, em especial:

Ao PROFESSOR Doutor João Nestor das Chagas e Silva, por ter aceitado ser meu orientador de estágio, pelos conhecimentos que me transmitiu durante o mesmo, pela forma como me deixou aprender e praticar, pelo fornecimento de documentação fundamental para a elaboração desta dissertação, pela amizade e por toda a paciência.

À CASA AGRÍCOLA POLICARPO por me ter permitido realizar o meu estágio curricular ao longo de 6 meses, em especial ao Nuno, Virgílio e Luís, por toda a disponibilidade, ajuda, simpatia e todos os conhecimentos transmitidos ao longo desse período.

À ASSOCIAÇÃO DOS JOVENS AGRICULTORES MICAELENSES, em especial ao Presidente Hélio Carreiro e aos Médicos Veterinários pela disponibilidade e hospitalidade com que sempre fui recebida durante os estágios realizados ao longo curso.

À PROFESSORA Isabel Neto, pela preciosa ajuda no tratamento estatístico.

À minha FAMÍLIA, em especial à minha MÃE e IRMÃOS (Valter, Paula e Tânia), por terem feito de mim, parte da pessoa que sou hoje e por sempre me terem acompanhado de forma tão presente em todas as etapas da minha vida, não tendo sido esta uma excepção.

Aos meus SOBRINHOS, Valter Guilherme e Maria, simplesmente por existirem e me fazerem sorrir e viver a vida com mais alegria.

Aos meus AMIGOS (Sara, Catarina, Tânia, Hugo, Nuno e Fred), que estão sempre comigo e que, de uma forma ou outra, me ajudam e me dão força para alcançar e ultrapassar cada meta, com os quais sei que posso sempre contar. Sempre do meu lado, mesmo estando longe.

A todos os meus COLEGAS DE CURSO que tornaram estes 6 anos inesquecíveis. Em especial aos amigos que vieram dos Açores (Gonçalo Antunes, Sílvia Barros, Sílvia Botelho e Sofia Oliveira), pelas longas horas de estudo e trabalho, pela amizade, companheirismo e disponibilidade, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus COLEGAS DE ESTÁGIO (Gonçalo Pereira e Nélia Luz) que me acompanharam nesta etapa final, pelo apoio que demonstraram ao longo de todo o estágio, pela amizade, companheirismo e farra.

De uma forma especial agradeço ao meu colega GONÇALO PEREIRA por se ter disponibilizado a ser o meu tradutor, sem dúvida que sem a sua ajuda, a elaboração desta dissertação teria sido um desafio muito maior.

Gostaria também de dirigir uma pequena palavra de “agradecimento” à minha gata, MIA, por me ter acompanhado incondicionalmente ao longo desde 6 anos, sempre com uma pata amiga, nos bons e maus momentos.

## ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE OVULAÇÃO EM VACAS DA RAÇA FRÍSIA HOLSTEIN - OVSYNCH E DOUBLESYNCH

### RESUMO

Os protocolos de sincronização do estro e/ou ovulação em bovinos de leite surgiram como uma ferramenta para auxiliar o controlo do progressivo declínio da fertilidade neste sector. Estes programas baseiam-se na utilização de hormonas como prostaglandina  $F_2$  alfa, hormona libertadora de gonadotrofina e progesterona. Uma vez que a utilização de estrogéneos está proibida na União Europeia desde 14 de Outubro de 2006, estas substâncias não fazem parte dos programas europeus de controlo farmacológico do ciclo éstrico. Existem protocolos de sincronização da ovulação desenhados para permitir a inseminação em tempo fixo (IATF) sem necessidade de detecção do cio, já que esta última é um dos principais factores de insucesso da inseminação artificial (IA) nas explorações de leite.

Neste trabalho procurou avaliar-se o resultado da introdução de um novo protocolo Ovsynch modificado (Doublesynch) numa exploração de bovinos da raça Frísia Holstein, do concelho da Moita, através do estudo das percentagens de animais com diagnóstico de gestação (DG) positivo, estabelecendo a comparação entre este tratamento (Doublesynch) ( $n=15$ ), o protocolo Ovsynch ( $n=15$ ), um grupo controlo negativo (cio espontâneo) ( $n=13$ ) e um grupo controlo positivo ( $PGF_{2\alpha}$ ) ( $n=15$ ).

O protocolo Doublesynch difere do Ovsynch tradicional pelo facto de associar uma dose adicional de  $PGF_{2\alpha}$ , administrada dois dias antes da primeira administração de GnRH do protocolo Ovsynch tradicional.

No grupo Doublesynch obteve-se uma percentagem superior de animais com DG positivo comparativamente ao grupo Ovsynch (20,0% vs 13,3%, respectivamente). No entanto, estes animais submetidos a um protocolo de IATF tiveram uma percentagem de DG positivo inferior aos animais dos grupos controlo negativo (30,8%) e positivo (40,0%). Contudo, os dados não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,377$ ), pelo teste exacto de Fisher bilateral, muito possivelmente devido ao reduzido número da amostra em cada grupo ( $n=13/15$ ).

Deste modo, pouco se poderá efectivamente concluir, com base no tratamento estatístico, a cerca dos eventuais benefícios da aplicação do protocolo Doublesynch, relativamente ao Ovsynch. Estudos futuros deverão ser realizados com uma amostra populacional maior e com um desenho experimental mais completo, para avaliação de eventuais diferenças entre os dois protocolos de IATF.

**Palavras – chave:** Protocolos de sincronização; Inseminação artificial a tempo fixo; Doublesynch; Ovsynch.

# COMPARATIVE STUDY OF TWO OVULATION SYNCHRONIZATION PROTOCOLS IN HOLSTEIN-FRIESIAN COWS - OVSYNCH AND DOUBLESYNCH

## ABSTRACT

Ovulation and/or estrus synchronization protocols in dairy cattle emerged as a tool to reverse the decline of fertility in this sector. These programs are hormone based such as,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , gonadotropin releasing hormone and progesterone. Estrogen use is forbidden in the European Union since October 14<sup>th</sup>, 2006. There are some synchronization protocols designed to allow timed artificial insemination (TAI), without the need for heat detection, since this issue is one of the most important factors of dairy cattle artificial insemination (AI) failure.

The present work analyzed the introduction of a new modified Ovsynch protocol (Doublesynch) in a Holstein-Friesian dairy farm, located in Moita (Portugal), comparing the positive pregnancy diagnose (PD) from Doublesynch treated cows ( $n=15$ ), Ovsynch ( $n=15$ ), negative control (spontaneous heat) ( $n=13$ ) and positive control ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) ( $n=15$ ).

Doublesynch protocol differs from traditional Ovsynch by the use of an additional  $\text{PGF}_{2\alpha}$  administration, two days before first GnRH injection.

Doublesynch group had superior PD percentage comparing to Ovsynch group (20,0% vs 13.3%, respectively). But animals subject to TAI protocols had positive PD inferior to negative (30.8%) and positive (40,0%) controls groups. However, data didn't had statistically significant differences ( $p=0,377$ ), according to Fisher's exact test, most likely because of the small sized sample in each group ( $n = 13/15$ ).

So, it can't be conclude, according to the statistical treatment, that Doublesynch protocol has any benefits comparing to Ovsynch.

Further studies, with a much more cows, and a more complete experimental design, must be performed to analyze eventual differences between these two TAI protocols.

**Keywords:** Synchronization protocols; Timed artificial insemination; Doublesynch; Ovsynch.

## ÍNDICE GERAL

Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice Geral .....	v
Índice de Figuras .....	vii
Índice de Tabelas .....	viii12
Índice de Gráficos .....	viii
Lista de Abreviaturas .....	ix
Introdução Geral .....	1
Objectivos .....	2
Relatório de estágio .....	3
<b>1.Breves noções anatómicas funcionais do aparelho reprodutor da vaca .....</b>	<b>6</b>
1.1.Características anatómicas e funcionais do aparelho reprodutor feminino .....	7
1.1.1.Vulva .....	7
1.1.2.Vestíbulo .....	8
1.1.3.Vagina .....	8
1.1.4.Cérvix .....	8
1.1.5.Útero .....	9
1.1.6.Oviductos .....	10
1.1.7.Ovários .....	11
<b>2.Generalidades sobre o ciclo éstrico bovino .....</b>	<b>12</b>
2.1.Ciclo éstrico .....	13
2.2.Regulação endócrina do ciclo éstrico .....	15
2.3.Dinâmica folicular .....	20
2.4.Reinício da actividade ovárica pós-parto .....	24
<b>3.Generalidades sobre a inseminação artificial e estro .....</b>	<b>26</b>
3.1.Inseminação artificial .....	27
3.1.1.Vantagens e Desvantagens .....	29
3.1.2.Colheita e Processamento do sémen .....	30
3.1.2.1.Colheita de sémen .....	30
3.1.2.2.Processamento do sémen .....	31
3.1.2.2.1.Diluição .....	32
3.1.2.2.2.Acondicionamento do sémen .....	32
3.1.2.2.3.Armazenamento do sémen .....	33
3.1.3.Momento da Inseminação .....	33
3.1.4.Descongelamento da dose de sémen .....	34
3.1.5.Local de deposição do sémen .....	35
3.1.6.Factores que afectam a eficácia da IA .....	36
3.2.Estro .....	37
3.2.1.Comportamento de cio .....	38
3.2.2.Métodos auxiliares de detecção de cio .....	39
3.2.2.1.Pintura da base da cauda .....	39
3.2.2.2.Detectores de pressão (visuais - Kamar®, sensores) .....	40
3.2.2.3.Rufiões .....	40
3.2.2.4.Medição de índices de locomoção (Podómetros) .....	41
3.2.2.5.Medição da resistência eléctrica do fluido vaginal .....	42
3.2.2.6.Medição da temperatura corporal .....	42
3.2.2.7.Doseamento de progesterona ( $P_4$ ) .....	42
3.2.2.8.Registo de vídeo (circuito interno de televisão) .....	43
3.2.3.Conclusão .....	43
<b>4.Protocolos de indução e sincronização do estro e/ou ovulação .....</b>	<b>44</b>
4.1.Métodos de controlo do estro e/ou ovulação .....	45
4.2.Protocolos de sincronização do estro .....	47
4.2.1.Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ( $PGF_{2\alpha}$ ) .....	47
4.2.2.Progesterona ( $P_4$ ) .....	51



4.3. Protocolos de sincronização da ovulação .....	53
4.3.1. Protocolo Ovsynch.....	53
4.3.2. Modificações ao protocolo Ovsynch .....	55
4.3.2.1. Pré-sincronização (Protocolo Presynch) .....	55
4.3.2.2. Co-sincronização (Protocolo Cosynch).....	57
4.3.2.3. Sincronização selectiva (Protocolo Selectsynch) .....	58
4.3.2.4. Protocolo Ovsynch associado à progesterona (Ovsynch + CIDR) .....	58
4.3.2.5. Protocolo Heatsynch .....	59
4.3.2.6. Protocolo Doublesynch.....	60
4.4. Ressincronização após a 1ª IA pós-parto .....	61
<b>5. Trabalho experimental</b> .....	<b>63</b>
5.1. Introdução.....	64
5.2. Material e métodos .....	65
5.2.1. Caracterização da exploração .....	65
5.2.2. Animais.....	65
5.2.3. Desenho experimental.....	66
5.2.4. Detecção deaios .....	68
5.2.5. Diagnóstico de Gestação.....	68
5.2.6. Registo de dados e análise estatística.....	68
5.3. Resultados.....	69
5.4. Discussão .....	75
5.5. Conclusão.....	80
Bibliografia .....	81
Anexos.....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aparelho reprodutor da vaca (vista lateral), mostrando a sua posição dentro das cavidades pélvica e abdominal. Adaptado de Ball e Peters (2004a). ....	7
<b>Figura 2.</b> Cérvix de uma vaca (aberto dorsalmente). Adaptado de König e Liebich (2002)....	9
<b>Figura 3.</b> Oviducto de uma vaca. Adaptado de König e Liebich (2002). ....	10
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do ovário da vaca com diferentes formações cíclicas funcionais. Adaptado de König e Liebich (2002). ....	11
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática das fases do ciclo éstrico e respectiva variação hormonal. Adaptado de Peter et al. (2009). ....	15
<b>Figura 6.</b> Relação entre hipotálamo, hipófise e os ovários durante a fase folicular. Adaptado de Senger (2003b). ....	16
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática de ciclos éstricos de duas ondas (a) e de três ondas (b) e, da variação da secreção de gonadotrofinas (FHS e LH). Adaptado de Adams et al. (2008). ....	21
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática das interações hormonais durante o processo de selecção, utilizando o modelo de dois folículos. Adaptado de Ginther et al. (2001a).....	23
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do ciclo éstrico no pós-parto. Adaptado de Crowe (2008). ....	25
<b>Figura 10.</b> O Cio em fêmeas bovinas e suas características. Adaptado de Gordon (1996b). ....	39
<b>Figura 11.</b> Efeito do estado de desenvolvimento folicular sobre o tempo entre a administração de PGF <sub>2α</sub> e a exibição do cio, em bovinos. Adaptado de Lane et al. (2008)..	48
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática de protocolos baseados no uso PGF <sub>2α</sub> para a sincronização do estro em bovinos. Adaptado de Cavalieri et al. (2006).....	50
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática de diferentes opções de controlo do ciclo éstrico à base de progesterona. Adaptado de Lane et al. (2008). ....	53
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática do protocolo Ovsynch. Original da autora.....	54
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática do protocolo Presynch. Original da autora.....	56
<b>Figura 16.</b> Representação esquemática do protocolo Cosynch. Original da autora.....	57
<b>Figura 17.</b> Representação esquemática do protocolo Selectsynch. Original da autora. ....	58
<b>Figura 18.</b> Representação esquemática do protocolo Ovsynch + CIDR. Original da autora.....	58
<b>Figura 19.</b> Representação esquemática do protocolo Heatsynch. Original da autora.....	59
<b>Figura 20.</b> Representação esquemática do protocolo Doublesynch. Original da autora. ....	60
<b>Figura 21.</b> Representação esquemática das estratégias utilizadas para a ressincronização em bovinos. Adaptado de Stevenson (2005). ....	62
<b>Figura 22.</b> Representação esquemática dos tratamentos realizados no trabalho experimental. Original da autora. ....	67

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Casuística das actividades desenvolvidas durante o estágio em clínica de espécies pecuárias. ....	3
<b>Tabela 2.</b> Casuística das actividades desenvolvidas durante o estágio de reprodução. ....	5
<b>Tabela 3.</b> Marcos no desenvolvimento da tecnologia da IA. Adaptado de Gordon (2004b). ....	28
<b>Tabela 4.</b> Eficácia do protocolo Ovsynch, quando iniciado em diferentes dias do ciclo éstrico. Adaptado de Vasconcelos et al. (1999). ....	56
<b>Tabela 5.</b> Caracterização geral dos grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS). ....	69
<b>Tabela 6.</b> Relação do diagnóstico de gestação à 1ª IA nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS). ....	72
<b>Tabela 7.</b> Relação do diagnóstico de gestação à 1ª IA em vacas primíparas e múltiparas nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS). ....	72
<b>Tabela 8.</b> Relação do diagnóstico de gestação à 2ª IA nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS). ....	74
<b>Tabela 9.</b> Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos estatísticos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados. Grupo controlo negativo – cio espontâneo. ....	89
<b>Tabela 10.</b> Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos estatísticos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados. Grupo controlo positivo- PGF <sub>2α</sub> . ....	90
<b>Tabela 11.</b> Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos estatísticos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados. Grupo Ovsynch. ....	91
<b>Tabela 12.</b> Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos estatísticos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados. Grupo Doublesynch. ....	92

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Distribuição da variável “Intervalo Parto-1ª IA” entre os diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS). ....	71
<b>Gráfico 2.</b> Representação gráfica da percentagem de vacas primíparas com diagnóstico de gestação à 1ª IA nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS). ....	73
<b>Gráfico 3.</b> Representação gráfica da percentagem de vacas múltiparas com diagnóstico de gestação à 1ª IA nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS). ....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AB</b>	Antibiótico
<b>AM</b>	Manhã
<b>BE</b>	Benzoato de estradiol
<b>BSE</b>	Encefalopatia espongiforme bovina
<b>CC</b>	Condição corporal
<b>CE</b>	Cipionato de estradiol
<b>CIDR</b>	<i>Controlled internal drug release</i>
<b>CL</b>	Corpo (s) lúteo (s)
<b>cm</b>	Centímetro (s)
<b>DAD</b>	Deslocamento do abomaso à direita
<b>DAE</b>	Deslocamento do abomaso à esquerda
<b>DG</b>	Diagnóstico de gestação
<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol
<b>EE</b>	Electroejaculação
<b>FD</b>	Folículo dominante
<b>FL</b>	Folículo (s)
<b>FSH</b>	Hormona folículo-estimulante
<b>g</b>	Grama (s)
<b>GH</b>	Hormona de crescimento
<b>GnRH</b>	Hormona libertadora de gonadotrofinas
<b>HA</b>	Hipófise anterior
<b>HP</b>	Hipófise posterior
<b>IGF-1</b>	Factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1
<b>IGF-2</b>	Factor de crescimento semelhante à insulina tipo 2
<b>IGFBP</b>	Proteínas transportadoras das IGFs
<b>im</b>	Intramuscular
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>h</b>	Hora (s)
<b>IA</b>	Inseminação artificial
<b>IATF</b>	Inseminação artificial a tempo fixo
<b>MAD</b>	Membro anterior direito
<b>MHz</b>	MegaHertz
<b>min.</b>	Minuto (s)
<b>mL</b>	Mililitro (s)
<b>mm</b>	Milímetro (s)
<b>OV</b>	Ovulação
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	Prostaglandina F <sub>2</sub> alfa
<b>PM</b>	Tarde
<b>PRID</b>	<i>Progesterone-releasing intravaginal device</i>
<b>PTR</b>	Palpação transrectal
<b>PVE</b>	Período voluntário de espera
<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona
<b>QO</b>	Quiasma óptico
<b>RI</b>	Reflexo de imobilização
<b>s</b>	Segundo (s)
<b>TE</b>	Transferência de embriões
<b>VA</b>	Vagina artificial
<b>Spz</b>	Espermatozóide (s)
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>µg</b>	Micrograma (s)



## INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos tem-se vindo a observar o decréscimo progressivo dos índices reprodutivos em explorações intensivas de bovinos de leite, em particular da taxa de gestação, que se reflecte num acréscimo do intervalo entre partos (Lucy, McDougall & Nation, 2004). Esta diminuição progressiva das taxas de gestação deve-se principalmente às baixas taxas de concepção e constante declínio das taxas de detecção de cio. Taxas de gestação inadequadas são um dos principais obstáculos para a rentabilidade e sustentabilidade das explorações de bovinos leiteiros (Pursley & Bello, 2007).

Esta redução nos índices reprodutivos da exploração decorre de um conjunto de factores que engloba não apenas factores biológicos próprios ao animal (por exemplo, o balanço energético negativo, o nível nutricional, o arrastar do processo de involução uterina e a quantidade de leite produzido), mas ainda factores ambientais (conforto e bem-estar na exploração) e factores humanos, como sejam o manejo nutricional e a detecção de cios (Lucy, 2001; Rabiee, Lean & Stevenson, 2005; Thatcher et al., 2006).

Na tentativa de dar resposta às preocupações conjuntas dos proprietários e dos veterinários, e, em simultâneo, maximizar as probabilidades de uma fêmea ficar gestante com um número reduzido de inseminações (IA), foram-se desenvolvendo vários protocolos de sincronização de estro e/ou ovulação, alguns dos quais sem necessidade de detecção de cios. Na maioria destes protocolos, a manipulação das ondas de desenvolvimento folicular, associada ou não ao encurtamento da fase lútea, procura ainda diminuir o número de dias em aberto, indirectamente, permitindo assim, a redução do intervalo entre partos (Lucy *et al*, 2004; Cavalieri, Hepworth, Fitzpatrick, Shephard & Mcmillan, 2006; Lane, Austin & Crowe, 2008). No entanto, não existem soluções mágicas para o declínio reprodutivo em bovinos leiteiros de alta produção. Para um futuro imediato, a melhor abordagem será a de gerir de forma intensiva a biologia reprodutiva da vaca. Esta gestão deve incluir o tratamento do anestro, sincronização do primeiro serviço e ressincronização de segundos ou terceiros serviços. A longo prazo, uma abordagem genética, que incorpore características reprodutivas e de saúde nos índices de selecção irá corrigir parte deste declínio reprodutivo (Wichtel, LeBlanc & DesCôteaux, 2004).

O presente trabalho está dividido em três partes: a primeira descreve de forma resumida, as actividades realizadas durante o estágio; a segunda parte consiste numa revisão bibliográfica, que inclui noções anatómicas e fisiológicas do aparelho reprodutor da vaca, generalidades sobre o ciclo éstrico bovino, generalidades sobre a inseminação e estro e ainda protocolos de indução e sincronização do estro e/ou ovulação. Por fim, a terceira parte consta do trabalho experimental onde estão incluídos o material e métodos, a apresentação e interpretação dos resultados obtidos, a sua discussão e posteriores conclusões.

## OBJECTIVOS

As tendências actuais da indústria de bovinos de leite incluem o aumento do efectivo, o declínio da fertilidade e a globalização do mercado agrícola. Estas alterações derivam de uma pressão crescente para a diminuição dos custos e dos recursos de mão-de-obra, associados à produção de leite. Contraditoriamente, em simultâneo, tenta-se também atingir níveis mais elevados de fertilidade (Lucy, 2001; Cavalieri et al., 2006). A baixa eficiência reprodutiva é um problema mundial que afecta a indústria de lacticínios (Lucy, 2001).

Tendo em conta esta realidade, os objectivos gerais da minha dissertação de mestrado foram:

- Elaborar uma revisão geral tanto sobre o ciclo éstrico bovino, com realce dos fenómenos de desenvolvimento folicular cíclico, para depois abordar os protocolos desenvolvidos para manipular o ciclo éstrico em bovinos, bem como, uma breve revisão sobre aspectos anatómicos e fisiológicos do aparelho reprodutor em vacas e sobre a inseminação artificial e estro;
- Ultrapassar as dificuldades da detecção do cio, aumentando a taxa de submissão (relação entre o número de vacas inseminadas e o número de vacas prontas a ser inseminadas) e consequentemente reduzir os dias em aberto;
- Comparar a fertilidade entre dois protocolos de indução e sincronização da ovulação (OVSYNCH e DOUBLESYNCH);

## RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular incidiu em duas áreas diferentes. O primeiro foi realizado na área de clínica de espécies pecuárias, que teve início a 1 de Setembro de 2012, na Associação de Jovens Agricultores Micaelenses, tendo terminado a 23 de Dezembro de 2012. O segundo, na área de reprodução, que me permitiu a posterior elaboração deste trabalho, foi realizado ao longo de 5 meses na Casa Agrícola Policarpo, no período de 7 de Janeiro de 2013 a 30 de Junho de 2013.

Ainda no âmbito da reprodução, acompanhei a prática profissional do meu orientador, Doutor João Nestor das Chagas e Silva, nas suas saídas de campo, no âmbito de actividades de prestação de serviço. Durante este período, acompanhei visitas de controlo reprodutivo [avaliação da involução uterina e diagnóstico de gestação (DG)], bem como programas de superovulação e transferência de embriões (TE) na zona de Aveiro e Moita e, exame andrológico e recolha e congelação de sémen em touros na zona Montemor-o-Novo e Milfontes. Este acompanhamento foi de extrema importância, pois permitiu-me desenvolver a técnica de palpação transrectal (PTR) e assim fazer uma avaliação mais precisa do aparelho reprodutor feminino.

### I.Associação de Jovens Agricultores Micaelenses (S.Miguel)

No decorrer do estágio acompanhei, três dos médicos veterinários residentes da Associação, e participei na prática diária da clínica de campo de espécies pecuárias (bovinos, suínos, caprinos e equídeos).

Durante esse período, frequentei uma formação de inseminação artificial (IA), que decorreu no Matadouro de S.Miguel, com uma duração de 5 semanas, ministrada pelo Presidente da Associação, o Sr. Hélio Carreiro. Esta formação consistiu na aprendizagem da técnica de cateterização cervical, com deposição de corante (azul de metileno diluído) à entrada do corpo do útero dos animais ainda vivos e posterior observação *post mortem* dos respectivos aparelhos reprodutores.

Tabela 1. Casuística das actividades desenvolvidas durante o estágio em clínica de espécies pecuárias.

Área de intervenção	Actividades desenvolvidas	Número de casos
Reprodução	IA	20
	Metrite	23
	Retenção de placenta	19
	Resolução de parto distócico (vaca / cabra)	5 / 1



Tabela 1 (continuação). Casuística das actividades desenvolvidas durante o estágio em clínica de espécies pecuárias.

Área de intervenção	Actividades desenvolvidas	Número de casos
Cirurgia	Abomasopexia paralombar (DAD / DAE)	2 / 10
	Cesariana	3
	Redução do prolapso uterino	2
	Castração em porco	3
	Enucleação do globo ocular	3
	Remoção da terceira pálpebra (carcinoma de células escamosas do olho)	15
	Redução de hérnia umbilical	2
	Amputação da cauda	3
	Amputação do teto	1
	Remoção de tetos supranumerários	4
	Resolução de feridas resultantes de ataques de cães a vitelos	7
Clínica (Diagnóstico e Tratamento)	Diarreia (vitelos / vacas)	50 / 30
	Diarreia em suínos	10
	Pneumonia (vitelos / vacas)	60 / 47
	Pneumonia em suínos	5
	Pneumonia em equídeos	2
	Fotossensibilidade (fungo <i>Pithomyces chartarum</i> )	24
	Cetose	6
	Timpanismo (Espumoso/Gasoso)	3 / 4
	Hipocalcémia	21
	Indigestão (Bovinos / Caprinos)	4 / 2
	Mamites	28
	Queratoconjuntivite infecciosa bovina ( <i>Moraxella bovis</i> )	29
	Abcessos	9
	Problemas podais (bovinos / equídeos)	8 / 2
Outros	Colheita de tronco cerebral em bovinos (>48 meses) para controlo de BSE	17
	Necrópsia em bovinos	2
	Recolha de amostra de sangue	3
	Recolha de amostras de leite	7
	Aplicação de gesso para resolução de fractura do MAD em cabra	1

Legenda: Inseminação artificial (IA); Deslocamento do abomaso à direita (DAD); Deslocamento do abomaso à esquerda (DAE); Encefalopatia espongiforme bovina (BSE); Membro anterior direito (MAD).

## II.Casa Agrícola Policarpo (Moita)

Este estágio permitiu-me conhecer e acompanhar a rotina diária de uma exploração intensiva de vacas Frísias Holstein.

Durante esta estadia tive a oportunidade de acompanhar o aparo correctivo e preventivo das unhas, visitas da médica veterinária responsável pela qualidade de leite, visitas da equipa de médicos veterinários responsáveis pela clínica, bem como visitas de controlo reprodutivo. No âmbito do meu estudo que deu origem à minha dissertação de mestrado, fiquei responsável pela administração de hormonas [Prostaglandina  $F_2$  alfa ( $PGF_{2\alpha}$ ) e hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH)] necessárias para a realização de protocolos de inseminação a tempo fixo (OVSYNCH e DOUBLESYNCH).

Tabela 2. Casuística das actividades desenvolvidas durante o estágio de reprodução.

Área de intervenção	Actividades desenvolvidas		Realizado	Observado
Reprodução	Exame ginecológico	PTR	150	800
		Ecografia	10	300
	DG	PTR	10	60
		Ecografia	2	45
	Doenças Reprodutivas	Quistos ovários	3	-
		Útero Unicórnio	1	-
		Endometrites	2	-
	Colocação de comprimidos intra-uterinos		1	15
	Tratamento AB intra-uterino		-	37
	IA		1	150
	TE		-	20
	Sincronização de fêmeas para IATF		50	-
Cirurgia	Omentopexia paralombar direita (DAE)		-	2
	Cesariana		-	1
Clínica	Pneumonia (vitelos / vacas)		-	8 / 20
	Diarreia (vitelos / vacas)		-	10 / 15

Legenda: Palpação transrectal (PTR); Diagnóstico de gestação (DG); Antibiótico (AB); Inseminação artificial (IA); Transferência de embriões (TE); Inseminação artificial a tempo fixo (IATF).

## **1.BREVES NOÇÕES ANATÓMICAS E FUNCIONAIS DO APARELHO REPRODUTOR DA VACA**

## 1.1.CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS E FUNCIONAIS DO APARELHO REPRODUTOR FEMININO

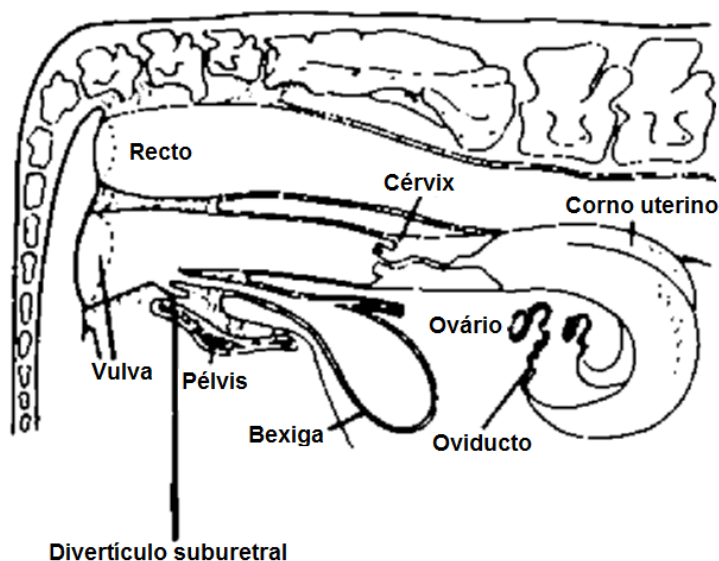
O aparelho reprodutor feminino está situado nas cavidades pélvica e abdominal e é composto pela vulva, vestibulo, vagina, cérvix, corpo do útero, dois cornos uterinos, dois oviductos e dois ovários (Ball & Peters, 2004a) (Figura 1).

Os órgãos internos (ovários, oviductos, cornos uterinos, corpo do útero e cérvix) são suspensos pelos ligamentos largos. Estes são constituídos pelos mesovários, que suportam os ovários; pelas mesossalpinges, que suportam os oviductos e pelo mesométrio, que suporta o útero (Hafez & Hafez, 2004a).

Os órgãos internos estão localizados por baixo do recto, o que permite, que uma palpação transrectal dessas estruturas seja feita com relativa facilidade (Prange & Duby, sem data).

O aparelho reprodutor feminino está vinculado à produção e transporte de oócitos, ao transporte de espermatozóides (spz), à fertilização e à acomodação do conceito até ao nascimento (Pansani & Beltran, 2009).

Figura 1. Aparelho reprodutor da vaca (vista lateral), mostrando a sua posição dentro das cavidades pélvica e abdominal. Adaptado de Ball e Peters (2004a).



### 1.1.1.Vulva

A vulva é constituída de ambos os lados, pelos lábios vulvares que se unem formando a comissura dorsal e ventral. A comissura dorsal é arredondada e a ventral é aguda (König & Liebich, 2002). Os lábios da vulva formam a abertura exterior do aparelho reprodutor feminino (Anónimo, 1987).

O clitóris localiza-se na comissura ventral e é composto por tecido erétil, revestido por um epitélio escamoso e estratificado, sendo rico em terminações nervosas sensitivas (Hafez & Hafez, 2004a).

### **1.1.2.Vestíbulo**

O vestíbulo é uma passagem comum para ambos os sistemas, urinário e reprodutor (Parker & Mathis, 2002). Tem início na vulva (König & Liebich, 2002) e estende-se cranialmente por aproximadamente 10 centímetros (cm), até onde o orifício uretral externo se abre na superfície ventral (Hafez & Hafez, 2004a). Este orifício apresenta um formato de uma fenda longitudinal de aproximadamente 2,5 cm de comprimento. Debaixo do mesmo há uma bolsa cega, o divertículo suburetral, que tem aproximadamente 3,5 cm de comprimento (Sisson, 1986).

A mucosa do vestíbulo é humedecida por acção das glândulas vestibulares (König & Liebich, 2002). As duas maiores estão situadas nas paredes laterais, sob o músculo constrictor da vulva. As glândulas vestibulares menores localizam-se ao longo do sulco ventral mediano (Sisson, 1986). A secreção dessas glândulas facilita a cópula durante o cio e o odor dessa secreção estimula sexualmente o macho (König & Liebich, 2002).

### **1.1.3.Vagina**

A vagina é uma estrutura tubular que se estende da vulva ao cérvix (Anónimo, 1987), com cerca de 25-30 cm de comprimento (Sisson, 1986). Contacta por cima com o recto, em baixo com a bexiga e lateralmente com os ossos da bacia (Britton, sem data).

A sua parede é resistente e elástica (Ball & Peters, 2004a), sendo constituída por uma superfície epitelial, uma camada muscular e uma serosa (Hafez & Hafez, 2004a). O revestimento epitelial sofre alterações durante o ciclo éstrico (Ball & Peters, 2004a).

As suas funções na reprodução são múltiplas. É um órgão copulatório onde o sémen é depositado na sua porção final (Hafez & Hafez, 2004a), durante a monta natural (Parker & Mathis, 2002). A vagina serve igualmente como ducto excretor das secreções cervicais, endometriais e tubárias e ainda, de via natural durante o parto (Hafez & Hafez, 2004a).

### **1.1.4.Cérvix**

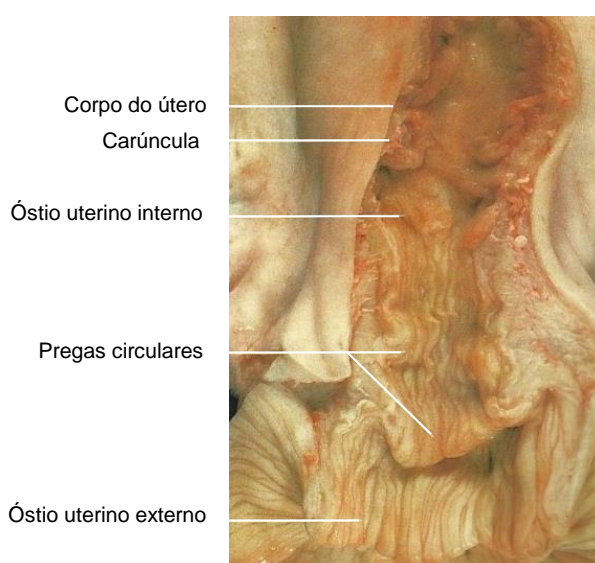
O cérvix é uma estrutura semelhante a um esfíncter, que se projecta caudalmente na vagina (Hafez & Hafez, 2004a). Deste modo, forma uma barreira entre a vagina e o útero (Ball & Peters, 2004a).

É um órgão fibroso composto predominantemente por tecido conjuntivo com pequenas quantidades de tecido muscular liso, caracterizado por uma parede espessa e por um lúmen constricto. O cérvix varia em comprimento de 2-3 cm em novilhas e cerca de 10 cm em vacas adultas. Possui um formato cilíndrico espiralado, com saliências fixas conhecidas como pregas (geralmente, 4 pregas) (Hafez & Hafez, 2004a), que podem ser distinguidas por palpação rectal (Prange & Duby, sem data). Está claramente demarcado do corpo do útero e da vagina, de modo que os óstios interno e externo são bastante distintos (Sisson, 1986).

Os óstios cervicais permanecem fechados, excepto no parto (Ball & Peters, 2004a) e durante o cio, quando relaxa levemente, permitindo o fluxo dos espermatozóides em direcção ao útero (Hafez & Hafez, 2004a).

O cérvix desempenha várias funções no processo reprodutivo: facilita o transporte de spz através do muco cervical (reotaxia) para o interior do útero; actua como reservatório de spz; pode tomar parte na selecção de spz viáveis, impedindo a passagem de células espermáticas inviáveis e defeituosas (Hafez & Hafez, 2004a) e confere protecção para o ambiente uterino durante a gestação (Pansani & Beltran, 2009) através da formação de um rolhão de muco espesso e acastanhado - o rolhão gelatinoso (Ball & Peters, 2004a) (Figura 2).

Figura 2. Cérvix de uma vaca (aberto dorsalmente). Adaptado de König e Liebich (2002).



### 1.1.5.Útero

É um órgão muscular, que se encontra imediatamente após o cérvix (Anónimo, 1987), formado por dois cornos uterinos que se unem no corpo do útero (König & Liebich, 2002). Está suspenso pelo mesométrio, na cavidade pélvica ou abdominal (Britton, sem data). Relaciona-se dorsalmente com o recto e ventralmente com a bexiga (König & Liebich, 2002). O tamanho do útero depende de factores como a idade e o número de gestações (Ball & Peters, 2004a). O corpo uterino é relativamente curto e pouco desenvolvido (Parker & Mathis, 2002), com cerca de 3-5 cm de comprimento (Sisson, 1986), enquanto os cornos uterinos são mais longos e bem desenvolvidos (Parker & Mathis, 2002). Têm um comprimento médio de 30-40 cm, em animais não gestantes (Sisson, 1986).

A parede uterina varia de 3-10 milímetros (mm) de espessura e possui 3 camadas: o endométrio (camada interior); o miométrio (camada muscular) e o perimétrio (camada serosa exterior) (Ball & Peters, 2004a). O endométrio do corpo e cornos uterinos

apresentam as características carúnculas uterinas (proeminências ovais), que num útero grávidico podem atingir grandes volumes (Sisson, 1986).

A sua principal função é a de abrigar o embrião e, posteriormente, o feto, fornecendo protecção e nutrição adequada para o seu desenvolvimento, para além do transporte de espermatozóides (Pansani & Beltran, 2009) e participação na regulação da função do corpo lúteo e início da implantação, na gestação e no parto (Hafez & Hafez, 2004a).

O corpo uterino é o local de eleição para a deposição de sémen na inseminação artificial (Prange & Duby, sem data).

#### 1.1.6.Oviductos

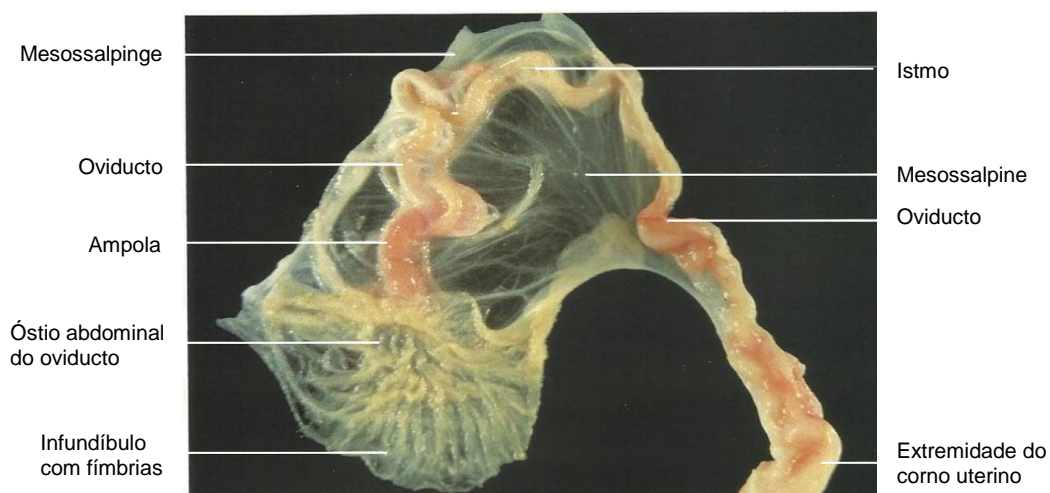
São estruturas tubulares (König & Liebich, 2002), também conhecidas como trompas de Falópio ou trompas uterinas (Ball & Peters, 2004a). Estendem-se da extremidade cranial do corno uterino até ao bordo do ovário (Prange & Duby, sem data). São pares, com um estreito lúmen irregular e de trajecto sinuoso, suspensos pelas mesossalpínges (König & Liebich, 2002).

O oviducto tem cerca de 20-30 cm de comprimento e aproximadamente 2-3 mm de diâmetro. Tem por função primordial o transporte gamético e do embrião (Ball & Peters, 2004a).

É constituído por três segmentos: o infundíbulo (com fímbrias), a ampola e o istmo (Ball & Peters, 2004a).

A extremidade distal do oviducto (próximo do ovário) tem a forma de um funil, o infundíbulo, que recebe o ócito libertado com a ovulação. Após o infundíbulo, segue-se uma região mais larga do oviducto, a ampola, local onde ocorre a fecundação. O ócito permanece alguns dias na ampola, sendo então transportado através do longo, sinuoso e estreito segmento proximal do oviducto, o istmo, para a extremidade do corno uterino (König & Liebich, 2002) (Figura 3).

Figura 3. Oviducto de uma vaca. Adaptado de König e Liebich (2002).



### 1.1.7.Ovários

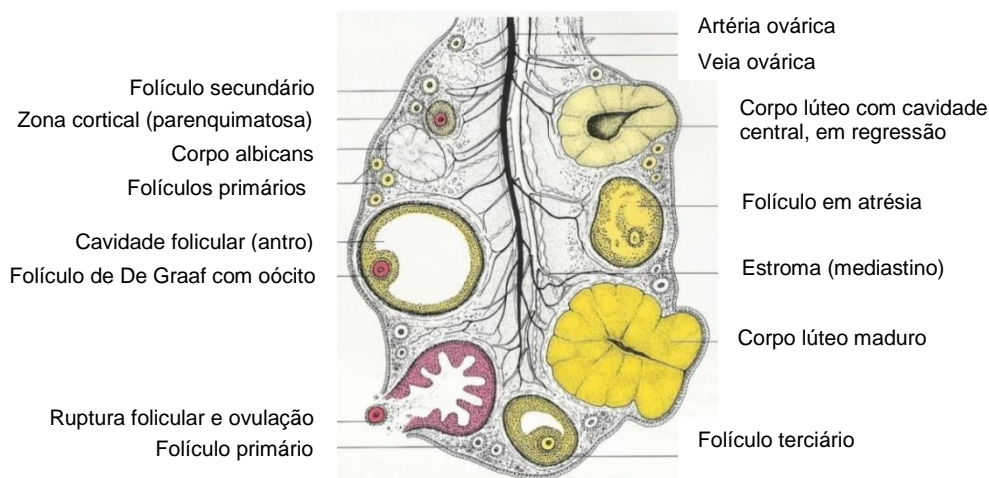
Os ovários são órgãos essenciais do aparelho reprodutor da fêmea (Prange & Duby, sem data) e, encontram-se na extremidade dos cornos uterinos (Anônimo, 1987). Possuem geralmente o formato de uma amêndoa (Hafez & Hafez, 2004a) e medem, normalmente, cerca de 3,5-4 cm de comprimento e aproximadamente 1,5 cm de largura. O peso é de 15-20 gramas (g) (Sisson, 1986). A sua estrutura não é estática e a aparência muda ciclicamente, dependendo da fase do ciclo reprodutivo (Ball & Peters, 2004a).

Os ovários estão suspensos por dois ligamentos: o próprio, que vai do ovário até ao corno do útero e o mesovário (König & Liebich, 2002).

Têm tanto uma função exócrina (produção e libertação de oócitos) como endócrina [produção de hormonas esteróides - estradiol ( $E_2$ ) e progesterona ( $P_4$ ), e hormonas proteicas - relaxina, inibina, activina e folistatina] (Pansani & Beltran, 2009).

Folículos (FL) de diversos tamanhos são encontrados muitas vezes, projectando-se para além da superfície da gónada, bem como corpos lúteos (CL) (Sisson, 1986). Os folículos ovários desenvolvem-se, nas fêmeas adultas, na zona parenquimatosa, diferenciando-se no tamanho e grau de desenvolvimento. Podem distinguir-se: folículo primordial, folículo primário, folículo secundário, folículo terciário e folículo de De Graaf. Os FL encerram o oócito e o estradiol que produzem é responsável pela manifestação do comportamento de cio. Após a ovulação, forma-se o CL, que produz  $P_4$  que prepara o útero para a implantação do oócito fecundado. A regressão do CL (luteólise) é iniciada pela  $PGF_{2\alpha}$ , produzida pelo útero e transportada da veia uterina para a artéria ovárica. No final do processo de luteólise, permanece uma cicatriz do corpo lúteo (*corpus albicans*) (König & Liebich, 2002) (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática do ovário da vaca com diferentes formações cíclicas funcionais. Adaptado de König e Liebich (2002).





## **2. GENERALIDADES SOBRE O CICLO ÉSTRICO BOVINO**

## 2.1.CICLO ÉSTRICO

Após a puberdade, a fêmea entra em um período de ciclicidade reprodutiva, que continua durante a maior parte da sua vida (Senger, 2003a). Short (1984), citado por Hartigan (2008), definiu a puberdade como o momento em que a fêmea apresenta cio e ovula pela primeira vez.

Em condições normais de criação, a puberdade ocorre por volta dos 12 meses em bovinos (Hafez & Hafez, 2004b), com uma variação de 7 a 18 meses (Noakes, Parkinson & England, 2001a). O início da puberdade está mais intimamente relacionado com o peso corporal do que com a idade. Bovinos leiteiros atingem a puberdade quando o seu peso corporal representa 40 a 50% do peso adulto (Hopkins, 2003; Hafez & Hafez, 2004b; Stevenson, 2007).

As vacas são animais poliéstricos contínuos (Noakes et al, 2001a; Hopkins, 2003; Hartigan, 2008). Uma vez alcançada a puberdade, a actividade cíclica tem uma distribuição uniforme e regular ao longo de todo o ano (Senger, 2003a), excepto durante a gestação, o pós-parto, a lactação e em condições patológicas (por exemplo, infecções uterinas, retenção placentária) (Noakes et al., 2001a; Ball & Peters, 2004b). A ciclicidade também pode cessar caso as condições nutricionais sejam inadequadas ou as condições ambientais sejam extremas (Senger, 2003a).

O ciclo éstrico que é definido como o período compreendido entre dois estros consecutivos (Binelli, Ibiapina & Bisinotto, 2006), tem uma duração média de 21 dias em vacas, com uma variação de 18-24 dias (Gordon, 1996a; Noakes et al., 2001a; Hopkins, 2003; Hafez & Hafez, 2004b). A duração do ciclo éstrico é muitas vezes 1 a 2 dias menor em novilhas que em vacas (Stevenson, 2007).

Classicamente divide-se o ciclo éstrico em quatro fases distintas, sendo estas: o Estro (dia 0 do ciclo); o Metaestro (dias 1-4, após o estro); o Diestro (dias 5-17, é a fase mais longa do ciclo); e o Pró-estro (dias 18-20, final do ciclo) (Ball & Peters, 2004b; Stevenson, 2007) (Figura 5).

Pró-estro tem início quando a progesterona diminui como resultado da luteólise (regressão do CL) e termina no início do estro (Senger, 2003a). Nesta fase do ciclo, há uma intensa actividade do sistema reprodutivo, uma vez que está a decorrer o crescimento folicular ao mesmo tempo que se regista a lise do corpo lúteo (Noakes et al., 2001a). É durante este período que o aparelho reprodutor feminino se prepara para o início do estro e acasalamento (Senger, 2003a). O endométrio apresenta-se mais congestionado e edematoso e as glândulas estão com as suas capacidades secretoras aumentadas. A mucosa vaginal torna-se hiperémica e o número de camadas das células do epitélio começa a aumentar (Noakes et al., 2001a).

Estro é caracterizado por ser o período de aceitação do macho por parte da fêmea (Stevenson, 2007). É também durante essa fase que a vaca exibe vários sinais secundários de comportamento de cio (por exemplo, vocalização, tentar montar outras vacas, *flehmen*) (Hopkins, 2003). O estradiol ( $E_2$ ) é a hormona dominante durante esta fase. Ele não só induz profundas alterações comportamentais, como também provoca grandes alterações fisiológicas no aparelho reprodutivo feminino (Senger, 2003a). As glândulas uterinas, cervicais e vaginais, aumentam a sua secreção, os epitélios vaginal e uterino encontram-se hiperémicos e congestionados. O cérvix está relaxado (Noakes et al., 2001a).

A ovulação, que ocorre no início do metaestro, é caracterizada pela ruptura de um folículo dominante (FD), conduzindo à libertação do fluido folicular, das células da granulosa e do oócito. Um CL forma-se no local onde ocorreu a ovulação. Embora os bovinos sejam espécies monotócicas (monovulatórias), ou seja, que ovulam normalmente um único FD, existe um certo número de múltiplas ovulações espontâneas causadas por uma variedade de factores (por exemplo, raça, número de partos, nutrição e estado reprodutivo) (Peter, Levine, Drost & Bergfelt, 2009). Ovulações duplas ocorrem em 4 a 5 % das vacas e as ovulações triplas, mais raramente (Noakes et al., 2001a).

Metaestro é o período entre a ovulação e a formação do corpo lúteo funcional. Nesta fase, tanto os níveis de estradiol como de progesterona ( $P_4$ ) são relativamente baixos (Senger, 2003a). Há uma redução significativa de produção de muco tanto no útero, como no cérvix e na vagina (Noakes et al., 2001a).

Diestro é a fase mais longa do ciclo éstrico e caracteriza-se pela existência de um corpo lúteo funcional e pela presença de níveis elevados de  $P_4$ . Estes promovem alterações no aparelho reprodutor feminino, de forma a preparar o útero para o desenvolvimento embrionário e eventual fixação do conceito no endométrio (Senger, 2003a). As glândulas uterinas sofrem hiperplasia e hipertrofia, com secreções viscosas e escassas, o cérvix está fechado e contraído e, a mucosa vaginal torna-se pálida (Noakes et al., 2001a). Este período termina com a regressão do CL (luteólise) (Senger, 2003a).

Contudo, como os bovinos têm comportamentos individuais consideravelmente diferentes entre si, a classificação mais aceite é feita de acordo com a função ovárica, sendo então definidas duas fases: Fase Folicular (corresponde ao pró-estro e estro) e a Fase Lútea (metaestro e diestro) (Ball & Peters, 2004b; Gordon, 2004a) (Figura 5).

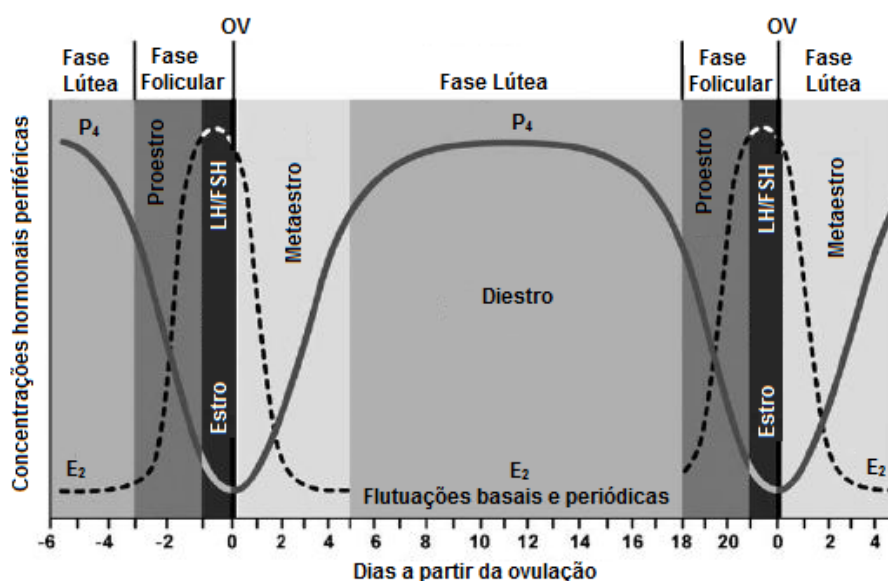
A fase folicular é o período que vai da regressão do corpo lúteo até à ovulação. Em geral, a fase folicular é relativamente curta, compreendendo cerca de 20% do ciclo éstrico. Durante a mesma, as estruturas ováricas dominantes são folículos em crescimento que produzem uma hormona, o estradiol (Senger, 2003a).

A fase lútea é o período que se estende da ovulação até a regressão do corpo lúteo. Esta fase é muito mais longa do que a fase folicular (cerca de 80% do ciclo éstrico). Neste período, a estrutura ovárica dominante é o corpo lúteo e a hormona reprodutiva primária é a

progesterona. Mesmo que a fase lútea seja dominada pela  $P_4$ , produzida a partir do corpo lúteo, os folículos continuam a crescer e a regredir durante esta fase, mas não produzem concentrações de  $E_2$  elevadas (Senger, 2003a).

A transição da fase folicular para a fase lútea é marcada pela ovulação, mas a transição da fase lútea para a fase folicular é mais complexa, sendo marcada pela rápida regressão do corpo lúteo, onde as prostaglandinas desempenham um papel importante (Gordon, 2004a).

Figura 5. Representação esquemática das fases do ciclo éstrico e respectiva variação hormonal. Adaptado de Peter et al. (2009).



Legenda: Ovulação (OV); Progesterona ( $P_4$ ); Estradiol ( $E_2$ ); Hormona luteinizante (LH) e Hormona folículo-estimulante (FSH).

## 2.2.REGULAÇÃO ENDÓCRINA DO CICLO ÉSTRICO

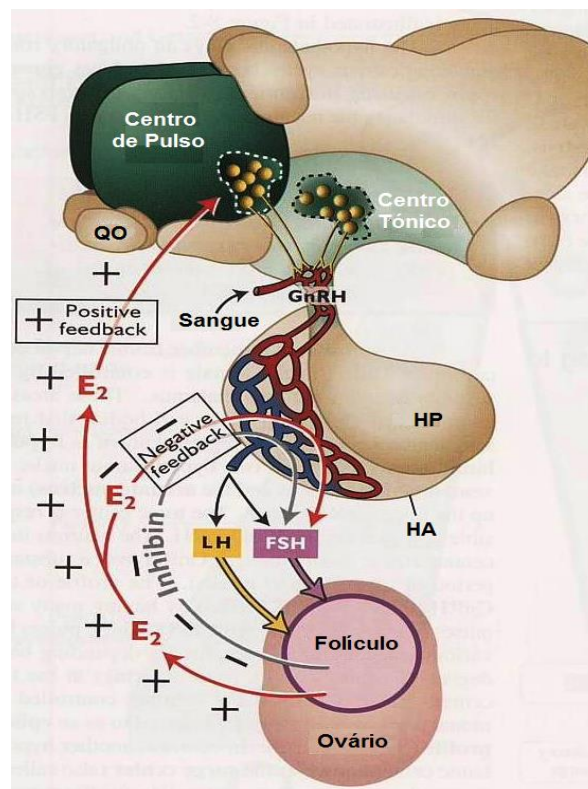
A compreensão dos mecanismos envolvidos no controlo do ciclo éstrico da vaca tem sido influenciada por uma série de grandes descobertas feitas desde 1950. Duas das mais importantes foram, a descoberta e desenvolvimento do conceito de hormona-receptor e a descoberta de que o hipotálamo e o cérebro regulam as secreções das hormonas da hipófise anterior por meio de uma série de pequenos péptidos de origem neurosecretora. Um destes péptidos hipotalâmicos é a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), que hoje sabe-se provocar a libertação de ambas as hormonas luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH), da hipófise anterior, sendo que estas, por sua vez, promovem a síntese de esteróides pelas gónadas (Gordon, 2004a).

A secreção de GnRH na fêmea é controlada por duas áreas separadas no hipotálamo. Estas áreas são constituídas por aglomerados de corpos de células nervosas que representam

regiões anatomicamente distinguíveis designadas de núcleos hipotalâmicos. Pelo menos dois núcleos hipotalâmicos (núcleo ventromedial e núcleo arqueado) constituem o centro de GnRH tônico. O centro tônico é responsável pela secreção basal de GnRH. Em contraste, o outro centro hipotalâmico conhecido como centro de pulsos (também chamado o centro pré-ovulatório) é responsável pela liberação pré-ovulatória de GnRH que estimula um aumento de LH, provocando a ovulação. Anatomicamente, o centro de pulsos é composto por três núcleos: o núcleo pré-óptico, a área hipotalâmica anterior e o núcleo supra-quiasmático. Este centro libera níveis basais de GnRH até que recebe o impulso positivo adequado. Em condições naturais, o pulso pré-ovulatório de GnRH ocorre apenas uma vez durante o ciclo estrico, enquanto a sua liberação tônica tem lugar durante todo o ciclo estrico (Senger, 2003b).

As funções ováricas (crescimento folicular, ovulação, luteinização e luteólise), bem como todas as alterações que ocorrem no aparelho reprodutor feminino, são reguladas por hormonas do hipotálamo (GnRH), da hipófise anterior (FSH e LH), do ovário (progesterona, estradiol e inibina) e do útero [prostaglandina  $F_2$  alfa ( $PGF_{2\alpha}$ )]. Estas hormonas funcionam através de um sistema de *feedback* positivo e negativo para regular o ciclo estrico (Forde, Beltman, Roche & Crowe, 2011) (Figura 6).

Figura 6. Relação entre hipotálamo, hipófise e os ovários durante a fase folicular. Adaptado de Senger (2003b).



Legenda: Quiasma óptico (QO); Hipófise anterior (HA); Hipófise posterior (HP); Hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH); Hormona Luteinizante (LH); Hormona foliculo-estimulante (FSH) e Estradiol ( $E_2$ ).

O ciclo éstrico é iniciado pela libertação de GnRH a partir do hipotálamo que, por sua vez, provoca a libertação de FSH e LH ao nível da hipófise anterior, dando-se assim o início do desenvolvimento e crescimento folicular (Ball & Peters, 2004b). Este processo, durante o ciclo éstrico de bovinos, ocorre num padrão de ondas (Gordon, 1996a). Cada onda folicular é geralmente precedida por um aumento transitório das concentrações periféricas de FSH (Ireland, Mihm, Austin, Diskin & Roche, 2000; Stevenson, 2007). Depois dos folículos serem recrutados e emergirem, entram numa fase de crescimento comum que está associada à fase decrescente da onda de FSH. Os níveis mínimos de FSH são atingidos na altura da diferenciação folicular (Ireland et al., 2000; Ginther, Beg, Bergfelt, Donadeu & Kot, 2001a; Peter et al., 2009).

Acredita-se que a regulação da libertação de FSH é feita pelos ovários e envolve uma interacção entre o estradiol e a inibina. O estradiol está envolvido no controlo a curto prazo da flutuação plasmática de FSH, enquanto a inibina regula os níveis, a longo prazo (Gordon, 1996a).

Embora o crescimento folicular possa ser estimulado isoladamente, pela FSH, uma combinação de FSH e LH induz uma síntese máxima de estradiol, *in vitro*. Assim, ambas as gonadotrofinas influenciam o desenvolvimento folicular e subsequente secreção de estradiol (Stevenson, 2007).

A FSH e a LH são as principais reguladoras da foliculogénese e esteroidogénese, com a LH como a principal hormona luteotrópica. A frequência de pulsos de LH é o principal determinante do destino final de um FD (Forde et al., 2011). No início da fase lútea surgem picos de LH de pequena amplitude, mas de elevada frequência (20-30 picos/24h). Na fase lútea propriamente dita, em que há maiores concentrações de  $P_4$ , temos picos de baixa frequência, mas uma elevada amplitude (6-8 picos/24h). Tanto o primeiro padrão de picos de LH, como o segundo são insuficientes para produzirem níveis de LH capazes de proporcionar a maturação final e consequente ovulação do FD (Ireland, 2000; Forde et al., 2011). Sendo assim, para que se voltem a registar níveis satisfatórios de LH (um pulso por hora) e se dê o desenvolvimento e maturação final de um folículo pré-ovulatório, é necessário haver níveis basais de  $P_4$ , subsequente aumento na produção de estradiol, um aumento da frequência dos picos de LH e, consequentemente, um folículo dominante em desenvolvimento. Mais tarde, surgirá o pico pré-ovulatório de LH (Crowe, 2008; Forde et al., 2011).

Cada um dos folículos em crescimento possui duas populações de células secretoras de esteróides: células da teca interna, que possuem receptores específicos para LH e as células da granulosa, que possuem receptores específicos para FSH (Hartigan, 2008). A síntese de estradiol requer a actividade coordenada destes dois tipos de células (teca interna e granulosa) e de duas gonadotrofinas (LH e FSH) - a chamada teoria de duas células/duas gonadotrofinas (Ginther, Wiltbank, Fricke, Gibbons & Kot, 1996; Gordon,

1996a). Quando a LH se liga aos receptores das células da teca interna, dá-se a formação de androgénios, que vão atravessar a membrana basal e entrar nas células da granulosa. Deste modo, quando a FSH se liga aos receptores das células da granulosa, estimula a actividade da enzima aromatase, que por sua vez, converte os androgénios em estradiol (Ginther et al., 1996; Stevenson, 2007).

Um aumento nas concentrações de  $E_2$ , resultante da rápida proliferação do folículo pré-ovulatório, concomitantemente com a diminuição das concentrações periféricas de  $P_4$ , induz um aumento na libertação GnRH que ao actuar na hipófise anterior vai originar tanto ondas de FSH, como de LH, sendo também, a seu tempo, responsável pelo aparecimento dos comportamentos de cio na fêmea (Hopkins, 2003; Senger, 2003b; Forde et al., 2011). Após essa elevação do estradiol, que leva aos picos pré-ovulatórios de FSH e LH e, consequentemente, à ovulação, as concentrações destas hormonas começam a diminuir, visto que se inicia a luteinização das células da teca interna e da granulosa, que são as responsáveis pela produção de estradiol (Hopkins, 2003; Senger, 2003b).

O pico de LH vai dar início ao processo de ovulação ao activar uma resposta inflamatória, fazendo com que a parede do folículo fique mais fina, acabando por romper (Ball & Peters, 2004b). Este processo é regulado por um grupo de mediadores intrafoliculares, que ao actuarem na membrana basal e nos capilares da teca, faz com que se crie uma zona de fragilidade (o estigma) (Stevenson, 2007).

Posteriormente à ovulação entramos na fase lútea, sendo caracterizada pela presença de um corpo lúteo funcional que produz quantidades significativas de progesterona. O principal papel da  $P_4$  durante a fase lútea é o de preparar o útero para receber o embrião, que pode ter resultado de fertilização do oócito recém-libertado (Ball & Peters, 2004b). A  $P_4$  também exerce um *feedback* negativo sobre a libertação de GnRH e, consequentemente, de LH, prevenindo assim, a maturação final do folículo dominante (Noakes et al., 2001a; Ball & Peters, 2004b). No entanto, as ondas foliculares continuam a crescer e a regredir, levando a aumentos transitórios nos níveis de estradiol (Ball & Peters, 2004b).

A hormona LH tem sido considerada como sendo o principal agente luteotrópico nas vacas e responsável por estimular a luteinização das células da teca interna e da granulosa do folículo pré-ovulatório (Ball & Peters, 2004b; Senger, 2003c; Hartigan, 2008; Forde et al., 2011).

O CL da vaca tem origem num folículo diferenciado, em que as células da teca interna e granulosa dão origem a células lúteas pequenas e grandes, respectivamente (Gordon, 2004a). Ambos os tipos celulares produzem progesterona. No entanto, as células lúteas pequenas possuem quase todos os receptores de LH e têm, *in vitro*, seis vezes mais capacidade de resposta à LH, relativamente, à produção de progesterona, que as células lúteas grandes. Contudo, as células lúteas pequenas representam cerca de 20% da população de células lúteas totais e contribuem aproximadamente com 15% da

progesterona produzida pelo corpo lúteo, enquanto o restante é da responsabilidade das células lúteas grandes. Estas, embora não tenham receptores de LH, têm uma grande quantidade de receptores para a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e  $\text{PGE}_2$ , e para além de produzirem progesterona, têm também a capacidade de produzir neurofisina e oxitocina, semelhante à produzida pelo hipotálamo e armazenada na hipófise posterior (Stevenson, 2007).

Deste modo, um CL totalmente formado é constituído por diferentes tipos de células: as células lúteas pequenas e grandes (secretoras de esteróides), fibroblastos, músculo liso, células endoteliais e pericitos. O CL é a glândula com maior suprimento sanguíneo por unidade de tecido de todo o organismo (Noakes et al., 2001a).

Se por volta do dia 16 do ciclo éstrico não ocorrer o reconhecimento materno da gestação (por acção do interferão TAU que é produzido pelas células trofoblásticas embrionárias), tem início a luteólise, sendo a principal hormona responsável por este processo, a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , produzida pelo útero (Forde et al., 2011; Shirasuna et al., 2012). Shirasuna et al. (2003), citados por Gordon (2004a), demonstraram que a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  também é produzida pelo CL. No entanto, a sua importância fisiológica permanece ainda pouco compreendida.

A  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , o principal agente luteolítico, é um derivado insaturado dos ácidos linolénico e araquidónico (Noakes et al., 2001a) e a sua produção tem início quando há libertação de oxitocina por parte do próprio CL. Quando há um aumento de oxitocina começa também haver um aumento de receptores para a mesma nas células endometriais e, consequentemente, dá-se início à conversão do ácido araquidónico em  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Ball & Peters, 2004b). Em seguida, a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produzida pelas células do endométrio chega ao ovário através de um mecanismo de contra-corrente, por difusão passiva, entre a veia uterina e a artéria ovárica. Dada a proximidade anatómica destes vasos, há passagem de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  da veia uterina para a artéria ovárica e, posteriormente para os ovários (mais precisamente para o CL) (Noakes et al., 2001a; Senger 2003c). Este mecanismo é de particular importância, uma vez que grande parte da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (cerca de 90%) que entra na circulação sistémica é metabolizada nos pulmões, dando origem aos seus metabolitos inactivos como a 15-ceto-13, 14-diidroprostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  (Silva, Teixeira & Vicente, 2010).

Pensa-se que o estradiol tem um papel fundamental na luteólise, pois é devido à sua elevação que se dá a síntese dos receptores de oxitocina nas células endometriais e, consequentemente, a produção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Stevenson, 2007). Deste modo, o momento e a magnitude da libertação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pelo útero são determinados pelas interacções sequenciais da progesterona, do estradiol e da oxitocina (Hartigan, 2008; Stötzel, Plöntzke, Heuwieser & Röblitz, 2012).

A luteólise ou regressão do corpo lúteo é caracterizada pelo declínio inicial da progesterona (luteólise funcional) seguido pela mudança da estrutura celular do espaço físico que compreendia o CL (luteólise estrutural ou morfológica) (Stötzel et al., 2012), ou seja, pela cessação da produção de progesterona e perda dos componentes e da integridade celulares



(regressão funcional e morfológica), incluindo redução do suprimento vascular, proliferação do tecido conjuntivo, aumento da desorganização celular, degenerescência e fagocitose das células lúteas (Noakes et al., 2001a; Silva et al., 2010).

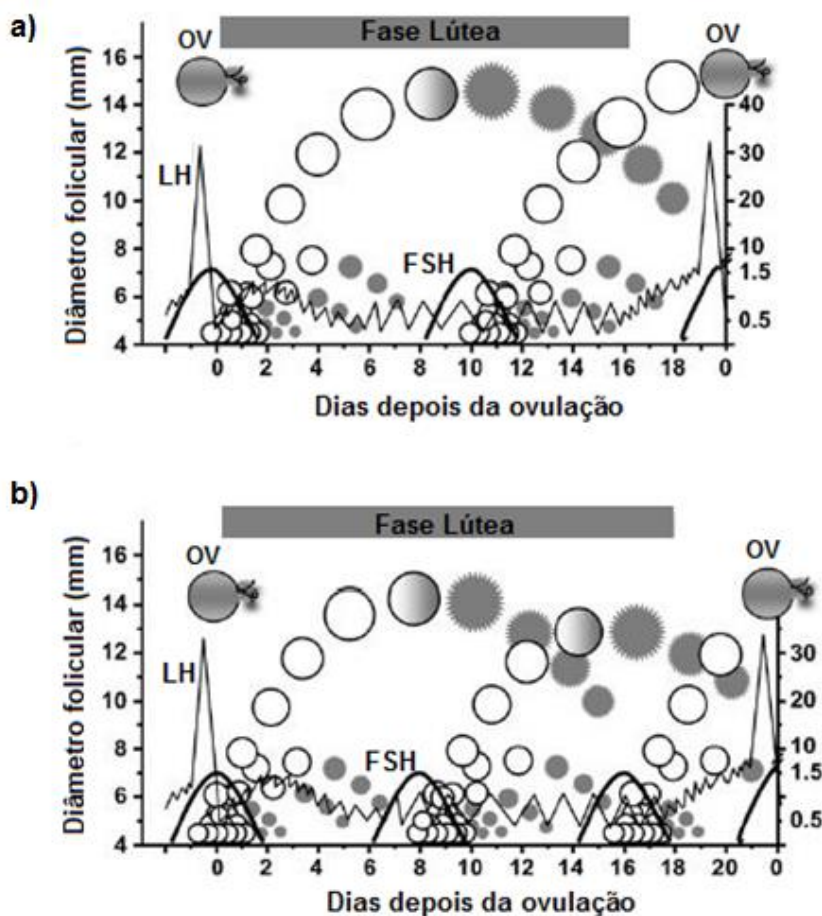
Actualmente, ainda existe alguma controvérsia relativamente ao mecanismo pelo qual a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  provoca a luteólise (Silva et al., 2010). Alguns autores defendem que a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  tem propriedades vasoconstritoras e assim, actua directamente no suprimento sanguíneo do CL (Stevenson, 2007; Hartigan, 2008). Sendo esta uma estrutura altamente vascularizada, entraria em regressão. No entanto, não foi determinado se a redução acentuada do fluxo sanguíneo no CL é uma consequência da luteólise ou se é responsável por esta (Stevenson, 2007). Tanto a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , como a endotelina 1 causam vasoconstrição e, consequentemente, hipóxia. A secreção de endotelina 1 é exacerbada pela hipóxia e igualmente, pela oxitocina. Para a regressão estrutural, considera-se que a endotelina 1 inicia uma cascata de eventos que levam ao recrutamento e à activação de células fagocitárias, as quais libertam citocinas responsáveis pela morte celular programada (apoptose) (Hartigan, 2008). Outros defendem que a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inibe a activação do sistema adenil-ciclase pela LH, bloqueando assim, a produção de progesterona pelas células lúteas (Ball & Peters, 2004b).

Com a luteólise há uma redução rápida da concentração de progesterona em circulação, que conduz a um aumento na produção de estradiol e em seguida, de gonadotrofinas, dando-se assim o início de mais uma fase folicular (Forde et al., 2011).

### **2.3.DINÂMICA FOLICULAR**

O desenvolvimento folicular, durante o ciclo éstrico das fêmeas bovinas, ocorre num padrão de ondas (Gordon, 1996a; Webb & Armstrong, 1998; Noakes et al., 2001a), mais precisamente em duas, três ondas por ciclo éstrico, sendo apenas a última onda a ovulatória (Webb & Armstrong, 1998; Binelli et al., 2006; Adams, Jaiswal, Singh & Malhi, 2008). Padrões de uma ou quatro ondas são raros (Gordon 2004a; Peter et al., 2009). Está provado que nos bovinos, 95% dos ciclos éstricos têm entre duas a três ondas de desenvolvimento folicular (Peter et al., 2009). Tanto em ciclos éstricos de duas como três ondas, a emergência da primeira onda folicular ocorre sempre no dia da ovulação. O surgimento da segunda onda verifica-se nos dias 9 ou 10, em ciclos de duas ondas e no dia 8 ou 9, em ciclos de três ondas. Nestes últimos, a terceira onda surge no dia 15 ou 16 (Driancourt, 2000; Adams et al., 2008) (Figura 7).

Figura 7. Representação esquemática de ciclos éstricos de duas ondas (a) e de três ondas (b) e, da variação da secreção de gonadotrofinas (FHS e LH). Adaptado de Adams et al. (2008).



Legenda: Ovulação (OV).

Cada onda de crescimento folicular consta de um grupo de folículos que se desenvolvem em conjunto e que a determinada altura, um deles é seleccionado e os outros sofrem atresia (Stevenson, 2007). Deste modo, o desenvolvimento folicular é caracterizado por três fases: o recrutamento (há um grupo de folículos que inicia um crescimento rápido devido à acção de gonadotrofinas), a selecção (processo em que um ou mais folículos recrutados são seleccionados para se desenvolverem ainda mais) e a dominância (que é um mecanismo pelo qual, geralmente, apenas um folículo se destaca dos restantes e com desenvolvimento muito rápido pode tornar-se num folículo pré-ovulatório) (Noakes et al., 2001a).

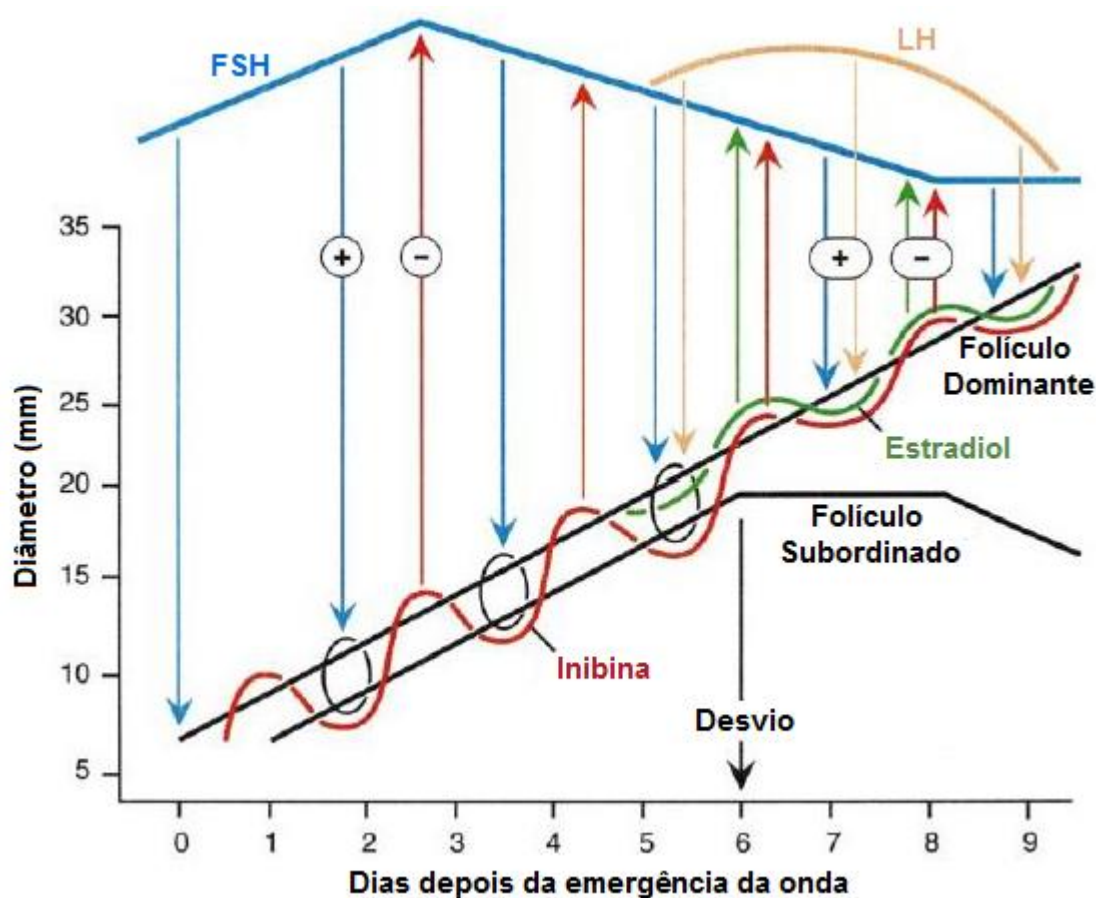
Demonstrou-se, nos bovinos, que a fase inicial do desenvolvimento folicular (FL <4 mm de diâmetro) é independente de um suporte de gonadotrofinas. No entanto, a FSH é necessária para o crescimento de FL com diâmetros entre os 4 a 9 mm e os pulsos de LH são indispensáveis para o desenvolvimento folicular após os de 9 mm de diâmetro (Gordon, 1996a; Webb & Armstrong, 1998; Lucy, 2007).

Logo após os picos pré-ovulatórios de gonadotrofinas (FSH e LH), regista-se normalmente um segundo pico de FSH, menor (Lucy, 2007; Wiltbank et al., 2011), responsável pela

emergência de um grupo de pequenos folículos antrícos (cerca de 5-20 FL). Isto marca o início da dependência do crescimento folicular relativamente à FSH. Este aumento transitório das concentrações de FSH também conduz a um aumento na actividade da enzima aromatase, nas células da granulosa, que converte androgénios em estradiol (Forde et al., 2011). À medida que os folículos vão crescendo, aumenta a sua capacidade de produção de estradiol e inibina, que em conjunto, suprimem, paulatinamente, a libertação de FSH. As concentrações decrescentes de FSH limitam o crescimento folicular e a maioria dos folículos recrutados entra em atresia (Binelli et al., 2006). Alguns estudos demonstraram que um aumento na quantidade de estradiol produzido pelo folículo de maiores dimensões, no início da fase de dominância, contribuía em grande escala para o declínio da FSH (Ginther, Bergfelt, Beg & Kot, 2001b), assim como a inibina, um componente proteico do fluido folicular, que também tem um efeito inibitório na produção de FSH e no crescimento folicular e, por esta via, um importante papel no declínio do estradiol (Ginther et al., 1996).

As importantes alterações autócrinas e/ou parácrinas que ocorrem no FD conferem-lhe funcionalidade com níveis basais de FSH e, assim, ocorre a síntese de receptores de LH nas células da granulosa e uma contínua produção de estradiol (Forde et al., 2011). Os receptores para FSH estão presentes apenas nas células da granulosa, enquanto os receptores para LH estão presentes, quer nas células da granulosa, quer nas células da teca interna, de todos os folículos antrícos. O FD adquire mais receptores para a LH nas células da granulosa que os outros folículos subordinados e, devido a isso, consegue alterar a sua dependência da FSH, para a dependência exclusiva da LH, facto que lhe permite continuar o seu crescimento, enquanto os subordinados entram em regressão (Adams et al., 2008). A mudança da dependência de FSH para LH foi encarada como o evento central no desenvolvimento do FD. Missouri et al. (1995), citados por Lucy (2007), concluíram que a aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa era crucial para o estabelecimento e a manutenção da dominância folicular, enquanto os receptores de FSH só desempenhariam um papel passivo (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática das interações hormonais durante o processo de selecção, utilizando o modelo de dois folículos. Adaptado de Ginther et al. (2001a).



Outros factores intrafoliculares, especialmente ao nível do FD, desempenham um papel na regulação do ciclo éstrico, quer directamente, através da alteração na síntese de estradiol, ou por meio de mecanismos de *feedback* negativo directo sobre o hipotálamo e hipófise anterior, como os factores de crescimento semelhantes à insulina tipo 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), suas proteínas transportadoras (IGFBP) e, suas proteases que são responsáveis pela biodisponibilidade de IGF-1 e IGF-2 no folículo ovárico (Forde et al., 2011). A IGF-1 é conhecida por estimular o crescimento folicular, aumentar a produção de estradiol, progesterona e androgénios, assim como aumentar a sensibilidade das células da granulosa à FSH (Ginther et al., 2001b).

Existe a evidência de que, na vaca, a hormona de crescimento (GH) também tem um papel na regulação da função ovárica, quer directamente, quer através da estimulação da síntese e secreção do IGF-1 pelo fígado (Noakes et al., 2001a).

Deste modo, o único folículo seleccionado (FD) suprime activamente as concentrações de FSH e assegura a supressão do crescimento de todos os outros folículos subordinados. O destino do FD é então dependente da frequência pulsátil de LH (Crowe, 2008). Em presença da progesterona, o FD entra em regressão ou atresia. Após a luteólise, o FD escapa à atresia e ovula (Binelli et al., 2006).

## 2.4. REINÍCIO DA ACTIVIDADE OVÁRICA PÓS-PARTO

Logo após o parto regista-se um período de anestro, considerado fisiológico, a seguir ao qual há um reinício da actividade cíclica, assim que se dá por concluída a involução uterina (Hopkins, 2003). É claro que o atraso no retorno à actividade reprodutiva é a forma da natureza assegurar que a progenitora tem recursos suficientes para atender às suas próprias necessidades e às dos seus recém-nascidos, nesse período (Gordon, 2004a).

Ainda durante a gestação, o crescimento folicular continua durante os dois primeiros trimestres, a intervalos regulares de 7-10 dias (Forde et al., 2011; Wiltbank et al., 2011). Ocorrem várias ondas de crescimento folicular, surgindo folículos, que podem ser detectados em ambos os ovários, com um máximo de 6 mm de diâmetro (Noakes, Parkison & England, 2001b). No final da gestação, o forte *feedback* negativo da progesterona (quer do CL, quer da placenta) e estradiol (produzido principalmente pela placenta) suprimem as elevações transitórias da FSH, necessárias ao crescimento folicular, cessando assim o desenvolvimento das ondas foliculares, nos últimos 20 a 25 dias de gestação (Forde et al., 2011).

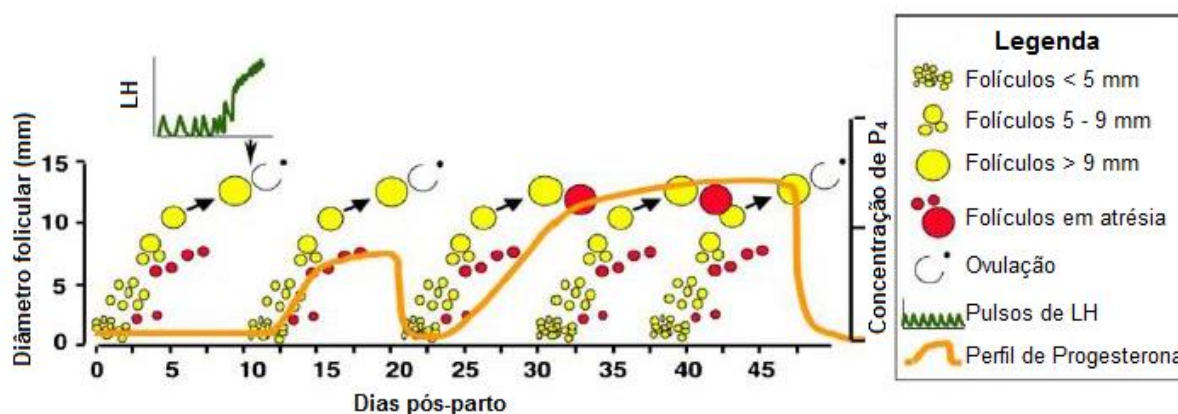
Por altura do parto, os níveis de progesterona e estradiol diminuem para concentrações basais, resultando em elevações recorrentes de FSH (nos 3-5 dias pós-parto), a intervalos de 7-10 dias. O primeiro aumento de FSH pós-parto estimula o desenvolvimento folicular, resultando num FD por volta dos dias 7-10 pós-parto. O destino desse primeiro FD é dependente da sua capacidade de produzir estradiol suficiente para induzir um pico de gonadotrofinas. A capacidade de secreção de estradiol é, por sua vez, dependente da frequência dos pulsos de LH durante a fase de dominância da onda folicular, do tamanho do FD e da biodisponibilidade em IGF-1. Assim, o grande impulsionador da ovulação de um FD, no período pós-parto é a frequência pulsátil de LH, de um pulso por hora (Crowe, 2008; Tanaka et al., 2008; Forde et al., 2011).

O FD que se forma por volta de 7-10 dias pós-parto tem três destinos possíveis: ovulação e formação de um corpo lúteo (30-80% das vacas), atresia e subsequente emergência de um segundo folículo dominante (15-60% das vacas) ou crescimento contínuo podendo tornar-se num quisto ovárico (1-5% das vacas) (Crowe, 2008; Tanaka et al., 2008; Wiltbank et al., 2011). Por esta razão, o destino do FD da primeira onda tem uma grande influência na duração no intervalo parto-primeira ovulação (Sheldon, Barrett & Body, 2008). Esta é, geralmente, silenciosa (ou seja, sem expressão de cio, pelo facto de ser necessária a presença de progesterona para se registar este tipo de resposta) e, normalmente é seguida por um ciclo éstrico mais curto, com apenas uma onda de crescimento folicular (Crowe, 2008). Acredita-se que as concentrações elevadas de estradiol (produzido principalmente pela placenta) em circulação na vaca durante a fase final da gestação possa induzir um estado refractário em que o cérebro não consegue responder, na ausência de uma pré-

sensibilização por parte da progesterona, à acção do estradiol, para induzir o comportamento de cio. Assim, o CL formado após a primeira ovulação (silenciosa) fornece a progesterona necessária para sensibilizar os receptores cerebrais, que são então capazes de responder ao estradiol, induzindo o comportamento de cio (Gordon, 2004a).

A fase lútea poderá ser mais curta devido à produção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por parte do endométrio. Assim, o corpo lúteo regride prematuramente, aproximadamente 8-10 dias do ciclo, com a segunda ovulação a ter lugar cerca de 9-11 dias, após a primeira. Esta segunda ovulação está geralmente associada à expressão de cio e a uma fase lútea de duração normal (Crowe, 2008) (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática do ciclo éstrico no pós-parto. Adaptado de Crowe (2008).



Estas fases lúteas de curta duração são cada vez mais frequentes devido a um insuficiente desenvolvimento dos folículos pré-ovulatórios. São mais prevalentes em animais que reiniciam a actividade cíclica mais precocemente, ou seja, em fêmeas que tiveram o retorno à ciclicidade entre os 0-5 dias pós-parto, a percentagem de fase lútea mais curta é de 100%; 60%, entre 10-15 dias pós-parto e 10%, entre 25-30 dias pós-parto (Noakes et al., 2001b).

A fertilidade da vaca após o parto depende da involução satisfatória do útero e do restabelecimento da actividade reprodutiva cíclica. Sessenta dias após o parto é geralmente o período de tempo referido como ideal para que uma vaca possa ser inseminada de forma a revelar uma taxa de concepção aceitável (Gordon, 2004a). No entanto, existem diversos factores que podem afectar o retorno à ciclicidade, nomeadamente a produção leiteira, a nutrição (peso corporal e condição corporal), a estação do ano, as doenças uterinas (por exemplo, metrites, endometrites, retenção placentária), os partos distócicos ou as doenças sistémicas (por exemplo, cetose, hipocalcémia, acidose, fígado gordo) (Ball & Peters, 2004c).

### **3.GENERALIDADES SOBRE A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E ESTRO**

### 3.1. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação artificial (IA) é a técnica reprodutiva mais importante como ferramenta para o melhoramento genético, já que poucos reprodutores seleccionados produzem sémen suficiente para inseminar milhares de fêmeas, anualmente. Em oposição, a progénie anual por fêmea é pequena, mesmo com o recurso à transferência de embriões (TE) (Ax et al., 2004). Por definição, a IA é a deposição de sémen, previamente colhido no macho, em local adequado do aparelho reprodutor feminino, sem que se realize a cópula (Sousa Guerra, 1978; Hopkins & Evans, 2003).

Sem dúvida, que tem sido a tecnologia reprodutiva mais importante, utilizada durante o século XX, em bovinos. Ao contrário de outras como a TE, que exige considerável experiência do técnico, quer de campo como de laboratório, para se ter sucesso, a IA é relativamente barata e simples de executar (Gordon, 2004b; Antunes, Marques, Santos, Chaveiro & Silva, 2008).

Um relatório da FAO estima que a contribuição da IA para a melhoria da produção leiteira em todo o mundo, desde da Segunda Guerra Mundial, foi equivalente às contribuições combinadas de uma melhor saúde, criação e nutrição (Gordon, 2004b).

A IA tem sido usada na maior parte das espécies domésticas, nas abelhas e ainda em seres humanos. Também tem sido usada ocasionalmente para a protecção de espécies raras ou ameaçadas de extinção, por exemplo, primatas, elefantes e felinos selvagens (Morrell, 2011).

Devido à gestão intensiva da actual produção de bovinos leiteiros, a maioria das fêmeas (mais do que 70%) são beneficiadas por IA (Althouse, 2007).

O mais antigo registo sobre a utilização da IA data de 1780, quando o fisiologista italiano Spallanzani conseguiu o nascimento de cachorros por esse meio (Ax et al., 2004; Ball & Peters, 2004d; Althouse, 2007). Este mesmo cientista também estudou os efeitos da refrigeração do esperma sobre a sua viabilidade e longevidade (Althouse, 2007).

O sucesso obtido por Spallanzani não estimulou, de imediato, o estudo e a aplicação da IA. Só bastante mais tarde, nos finais do século XIX, os investigadores se interessaram pelo assunto realizando trabalhos, tanto na Inglaterra como nos Estados Unidos (Sousa Guerra, 1978; Ball & Peters, 2004d; Althouse, 2007). Em 1902, o dinamarquês Sand, embora reconhecendo que a IA era um recurso importante na luta contra a infertilidade, foi o primeiro a destacar as notáveis potencialidades do método para incrementar o melhoramento animal (Sousa Guerra, 1978). Foi na Rússia que o processo foi seriamente considerado como método de melhoramento. Ivanov foi um dos grandes impulsionadores da IA. Tendo começado os seus trabalhos com garanhões e éguas foi, mais tarde, o primeiro a conseguir bons resultados em vacas e ovelhas (Sousa Guerra, 1978; Ball & Peters, 2004d; Althouse, 2007).



Algumas datas marcantes no desenvolvimento da tecnologia da IA estão detalhadas na Tabela 3.

Tabela 3. Marcos no desenvolvimento da tecnologia da IA. Adaptado de Gordon (2004b).

Anos	Eventos	Pesquisadores
1677	Descoberta de spz com a utilização de uma lente de aumentar (biconvexa)	Anton van Leeuwenhoek
1780	IA de uma cadela e subsequente nascimento de 3 cachorros, 62 dias mais tarde	Spallanzani
1803	Refrigeração de esperma de garanhão com neve e avaliação da motilidade, após reaquecimento	Spallanzani
1890	Primeira tentativa de IA em cavalos, em França	Repiquet
1899	Início de trabalhos de IA em cavalos na Universidade de Moscovo	Ivanov
1912	Demonstrou-se que os resultados obtidos por IA em éguas eram comparáveis aos obtidos por monta natural; sucesso em bovinos e ovinos	Ivanov
1914	Início dos trabalhos em Itália, que levaram à construção da vagina artificial (VA) para a colheita de sémen em cães	Amantea
1920-1930	Desenvolvimento na Rússia de VA para uso em touros, garanhões e carneiros; desenvolvimento de diluidores simples	Milovanov
1937	Desenvolvimento do método rectovaginal de IA em bovinos	Vários investigadores dinamarqueses
1941	Desenvolvimento de diluidores de sémen contendo gema de ovo e citrato de sódio para bovinos	Salisbury
1946	Antibióticos (penicilina e estreptomicina) usados para controlar microorganismos patogénicos em sémen utilizado na IA	Almquist
1949	Descoberta das propriedades crioprotectoras do glicerol permitindo o congelamento de esperma de várias espécies	Polge
1952	Primeiro bezerro nascido (Frosty I) após o uso de sémen de touro congelado-descongelado em Cambridge	Polge e Tim
1960	Azoto líquido tornou-se o líquido criogénico de eleição para a preservação de sémen de touro	Vários investigadores
1965	Comercialização das palhinhas francesas médias (0,5 mL) e minis (0,25 mL)	Cassou

Legenda: Espermatozóides (spz); Vagina artificial (VA); Mililitro (mL).

### **3.1.1.Vantagens e Desvantagens**

Não é difícil falar das vantagens da IA. No entanto, a sua aplicação impõe o respeito por certas limitações e cuidados, para que se possam obter os resultados mais desejáveis, sem que se manifestem alguns inconvenientes (Sousa Guerra, 1978).

O melhoramento genético é, provavelmente, a principal vantagem da IA e, em conjunto, com o controlo de doenças de transmissão venérea, constituíram uma das principais razões para o seu desenvolvimento (Ball & Peters, 2004d; Morrell, 2011).

Quando a tecnologia é adequadamente executada, existem poucas desvantagens na sua utilização (Ax et al., 2004).

Vantagens:

- IA ajuda a evitar a propagação de doenças infecciosas ou contagiosas, que podem ser transmitidas quando os animais estão em contacto (por exemplo, cópula) ou partilham o mesmo ambiente (Antunes et al., 2008; Morrell, 2011);
- Melhoramento genético mais rápido do rebanho e a um baixo custo, através da utilização de sémen de reprodutores testados, geneticamente superiores para a produção de leite ou de carne (Antunes et al., 2008; Morrell, 2011);
- Permite a reprodução entre animais de diferentes localizações geográficas, ou em momentos diferentes (mesmo depois da morte do macho) – criopreservação do material seminal (Antunes et al., 2008; Morrell, 2011);
- Permite a beneficiação em casos de anomalias físicas, fisiológicas ou comportamentais (Antunes et al., 2008; Morrell, 2011);
- Cada vez que se efectua a IA numa vaca, o seu aparelho reprodutivo é examinado, ajudando assim na detecção precoce e eventual tratamento de qualquer enfermidade (Antunes et al., 2008);
- IA é uma ferramenta poderosa quando associada a outras biotecnologias reprodutivas, como a criopreservação ou sexagem de spz (Morrell, 2011);
- Criação de bancos de sémen, que permite envolver elevadas transacções comerciais, com a exportação para qualquer ponto do planeta (Sousa Guerra, 1978);
- IA pode ser usada na conservação de raças ou espécies ameaçadas de extinção (Morrell, 2011);
- IA é uma técnica relativamente segura, simples e barata (Noakes, Parkinson & England, 2001c).

Desvantagens:

- Alguns machos podem eliminar agentes patogénicos através do sémen, sem manifestarem sinais clínicos da doença (Morrell, 2011);
- Algumas bactérias patogénicas são resistentes aos antibióticos dos diluidores de sémen ou podem evitar os seus efeitos através da formação de biofilmes (Morrell, 2011);

- Defeitos genéticos podem ser amplamente disseminados, principalmente as características recessivas (Noakes et al., 2001c);
- A utilização repetida de certos touros ou de certas linhagens pode resultar na perda da variabilidade genética, ou seja, aumento da endogamia (Morrell, 2011);
- Obriga à implementação de um bom sistema de detecção de cio (Noakes et al., 2001c).

### **3.1.2.Colheita e Processamento do sémen**

Todos os touros jovens admitidos para a IA são avaliados para a libido, morfologia dos testículos, produção de sémen e viabilidade dos spz após a descongelação (Gordon, 1996b).

Até que o sémen se encontre em condições de poder ser aplicado é sujeito a uma série de operações destinadas a permitir conservá-lo a muito baixas temperaturas, mantendo o seu poder fecundante. Começa-se pela colheita, segue-se o exame macroscópico e microscópico, a diluição, o equilíbrio e congelação, controlo de qualidade, armazenamento e por fim, a respectiva aplicação (Sousa Guerra, 1978).

#### **3.1.2.1.Colheita de sémen**

Uma correcta colheita de sémen é dos factores mais importantes para um programa de IA (Ax et al., 2004). A colheita de sémen de um touro tem início depois de ele ter sido aprovado após um processo selectivo de índole genética e física (Ball & Peters, 2004d).

Hoje em dia, nos bovinos, a colheita processa-se quase exclusivamente por meio de uma vagina artificial (VA), utilizando-se pouco os métodos como a electroejaculação (EE) ou mesmo a massagem transrectal da zona ampolar (Sousa Guerra, 1978; Noakes et al., 2001c; Hopkins & Evans, 2003).

Se o sémen de um touro é recolhido com muita frequência, o volume e a qualidade seminais reduzir-se-ão. Na prática, tem que haver um compromisso entre a produção total máxima e um rendimento razoável em cada colheita (Ball & Peters, 2004d). Isto significa que a maioria dos touros IA são sujeitos a duas colheitas diárias, duas a três vezes por semana, ao longo da sua vida produtiva, que geralmente se prolonga por 5 a 6 anos (Ax et al., 2004; Ball & Peters, 2004d).

A qualidade e quantidade do sémen produzido são reforçadas pela estimulação que os touros são submetidos antes da colheita. Isso geralmente envolve o incentivo de várias falsas montas antes da ejaculação (Ball & Peters, 2004d).

A colheita por VA exige um animal dócil e treinado e instalações amplas para lidar tanto com o touro que vai montar como com o manequim, vivo (boi, touro ou vaca) ou “vaca” mecânica (“dummy cow”) (Hopkins & Evans, 2003; Morrell, 2011).

A VA é um aparelho que, no momento da colheita, imita convenientemente a vagina da fêmea, permitindo obter uma ejaculação normal e a recolha fácil e higiénica do sémen emitido. O aparelho tem de obedecer a requisitos que o façam assemelhar funcionalmente à vagina da fêmea em cio, devendo portanto, estar à temperatura dos órgãos genitais femininos, exercer uma pressão idêntica sobre o pénis [estes parâmetros são conseguidos com a introdução de água quente - 45 graus Celsius (°C) e ar, respectivamente], e permitir uma penetração tão fácil como acontece no acto natural com as secreções vestibulares e vaginais, o que se consegue com o uso de lubrificantes adequados (lubrificante não espermicida) (Sousa Guerra, 1978; Hopkins & Evans, 2003; Ball & Peters, 2004d). É comum fazer-se a colheita de sémen, com o reprodutor a montar um animal devidamente contido, como um boi, touro ou uma vaca. Os touros podem também ser treinados a montar num manequim mecânico (Sousa Guerra, 1978; Ax et al., 2004; Ball & Peters, 2004d).

A EE requer um mínimo de prática e é bastante simples de executar (Hopkins & Evans, 2003). Está reservada sobretudo para a realização de exames andrológicos em condições de campo, bem como, para touros velhos ou incapazes de encabritar, ou muito agressivos, ou ainda, touros que perdem temporariamente o desejo de servir na VA (Sousa Guerra, 1978; Hopkins & Evans, 2003; Ax et al., 2004). Existem diferenças de tamanho da sonda rectal, e de orientação e número dos eléctrodos (Hopkins & Evans, 2003). A técnica consiste na introdução de uma sonda ou de eléctrodos anelares no recto do animal, sobre o local onde se encontram os nervos que abordam os órgãos reprodutores que são então estimulados electricamente. A voltagem é gradativamente aumentada com pulsos de estimulação rítmicos e repetidos (Ax et al., 2004; Althouse, 2007).

O ejaculado recolhido com VA é mais uniforme, concentrado e geralmente menos sujeito à contaminação, em relação a um ejaculado recolhido por EE (Hopkins e Evans, 2003).

O volume de um ejaculado é inferior a 10 mL (média de 4 mL) e contém de 2 a 12 bilhões (média de 4 bilhões) de spz. O ejaculado é posteriormente avaliado quanto ao volume, cor, cheiro, fluidez, opacidade, motilidade, morfologia e concentração de spz (Althouse, 2007).

#### 3.1.2.2. Processamento do sémen

A qualidade do ejaculado condiciona a fertilidade do macho (Sousa Guerra, 1978). Após a recolha, o ejaculado é transportado para laboratório e o tubo de recolha é colocado num banho-maria, estufa ou placa de aquecimento a 35-37 °C, para estabilização da temperatura (Sousa Guerra, 1978; Hopkins & Evans, 2003). Então é avaliada a qualidade do sémen, procedendo-se ao exame macroscópico (volume, cor, cheiro, fluidez/opacidade), ao exame microscópico (motilidade massal, motilidade individual, morfologia e vitalidade) e determinação da concentração espermática (Sousa Guerra, 1978, Noakes et al., 2001c; Hopkins & Evans, 2003; Ball & Peters, 2004d; Gordon, 2004b; Althouse, 2007).

Após o cálculo do número de doses seminais a preparar, segue-se a adição do diluidor para o efeito (Sousa Guerra, 1978; Noakes et al., 2001c; Hopkins & Evans, 2003).

#### 3.1.2.2.1. Diluição

Os diluidores têm por função: aumentar o volume do ejaculado, para que possa ser utilizado num maior número de fêmeas; fornecer condições favoráveis à manutenção do poder fecundante e à sobrevivência dos spz *in vitro* (Sousa Guerra, 1978; Noakes et al., 2001c; Morrell, 2011). Todos eles contêm substâncias que permitem uma protecção contra o choque térmico, crioprotecção, fonte de energia, tamponamento, manutenção da pressão osmótica e inibição de bactérias (Ball & Peters, 2004d).

Os diluidores mais frequentemente utilizados são o citrato ou o tris (tri-hidroxi-metilaminometano). Em todos entram, também, o glicerol, um açúcar e antibióticos (Sousa Guerra, 1978; Ball & Peters, 2004d).

Os açúcares (glucose e frutose, por exemplo) além de favorecerem a conservação dos spz são também uma fonte de energia (Sousa Guerra, 1978; Noakes et al., 2001c; Ball & Peters, 2004d).

Embora as apertadas regras higiénicas do processo de recolha poderem reduzir substancialmente a contaminação, antibióticos e outros agentes antibacterianos são normalmente adicionados aos diluidores. Tem sido sugerido que alguns agentes antibacterianos também podem ser benéficos para os spz de touro, diminuindo a sua actividade metabólica e/ou aumentando a sua longevidade (Noakes et al., 2001c; Gordon, 2004b; Ball & Peters, 2004d).

Para a criopreservação é indispensável que os diluidores contenham um crioprotector. Esta substância protege as células vivas face as baixas temperaturas, aumentando a sua resistência biológica. O efeito do glicerol é optimizado quando se mantém em contacto com os spz durante certo tempo antes da congelação (tempo de equilíbrio ou de glicerolização). Minimiza a formação de cristais de gelo no interior dos spz. A sua adição conduz a uma espécie de vitrificação em lugar da cristalização (Sousa Guerra, 1978; Hopkins & Evans, 2003).

Posteriormente à diluição final procede-se ao acondicionamento do sémen em doses individuais (Sousa Guerra, 1978).

#### 3.1.2.2.2. Acondicionamento do sémen

As formas de acondicionamento do sémen utilizadas procuram adaptar-se às condições próprias de cada região. Hoje em dia, as mais usadas são as palhinhas francesas. Contudo em alguns países ainda se usam os “*pellets*” ou pílulas, por se tratar de uma metodologia simples e barata (Sousa Guerra, 1978).

A indústria de IA bovina substituiu as ampolas pelas palhinhas, dada a capacidade de armazenamento mais eficiente destas últimas (uma ampola ocupa o espaço de 4 a 5 palhinhas) e, promoveu o desenho de melhores cânulas de inseminação para as palhinhas (Hopkins & Evans, 2003).

O inconveniente de mais espaço para o armazenamento, não se verifica com os “pellets” ou pílulas. No entanto, apresentam como inconvenientes a dificuldade de identificação individual das doses e a possibilidade de contaminação do sémen em contacto directo com o azoto líquido (Sousa Guerra, 1978).

O congelamento do sémen de touro em minipalhinhas (0,25 mL de capacidade) tem sido de uso comum desde 1969. Embora não haja qualquer diferença na fertilidade de sémen de touro acondicionado em palhinhas médias (0,50 mL) ou minipalhinhas (0,25 mL), claramente que um maior número de doses de sémen serão processadas em minipalhinhas a partir de um dado ejaculado (Gordon, 1996b).

#### 3.1.2.2.3. Armazenamento do sémen

O principal objectivo do armazenamento é conservar a vida fértil dos spz até a deposição no aparelho reprodutor feminino. Isto é conseguido através da minimização da exposição do sémen a condições prejudiciais, que têm um efeito aditivo, e reduzem a viabilidade e fertilidade do sémen (Nebel, 2007).

Deste modo, o armazenamento em contentores de azoto líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  tornou-se posteriormente o modelo padrão para a preservação a longo prazo do sémen e, ao longo dos últimos 40 anos, tem mantido incólume a fertilidade das doses seminais (Hopkins & Evans, 2003). No entanto, para se obter o máximo da eficiência reprodutiva, a temperatura das mesmas deverá manter-se permanentemente a uma temperatura inferior a  $-130^{\circ}\text{C}$ , até a sua utilização. Exposições a temperaturas superiores conduzem ao fenómeno de recristalização que provoca lesões nas estruturas intracelulares. Temperaturas superiores a  $-80^{\circ}\text{C}$  conduzem ao “efeito solução” que provoca a desnaturação de enzimas e da membrana celular ou a perda da integridade estrutural dos spz (Chagas e Silva, 1998).

#### 3.1.3. Momento da Inseminação

Uma vez que um resultado positivo após IA depende da deposição correcta de spz em um momento adequado em relação à ovulação, a detecção do cio é fundamental para que a fêmea possa ser inseminada em tempo oportuno (Morrell, 2011). Em consequência, a inseminação deverá ser efectuada na fase mais propícia do ciclo éstrico da vaca (Ball & Peters, 2004d). A fertilização ocorre no oviducto, na junção do istmo com a ampola. O tempo de vida útil do oócito é cerca de 12 a 18 horas (h) e a sua viabilidade diminui com o tempo. Cerca de 8 h após a cópula, um número suficiente de spz atinge o istmo do oviducto

(Baruselli, sem data). Os spz necessitam de algumas horas no trato reprodutivo da fêmea para se capacitarem e alcançarem total potencial de fertilização, permanecendo viáveis durante 24 h. O oócito tem melhores hipóteses de ser fertilizado se contactar com um espermatozóide viável, nas 6 h a seguir à ovulação (Ball & Peters, 2004d).

A IA deve ser realizada durante o cio, ou seja, antes de ocorrer a ovulação. Em termos práticos, tem-se como referência o início do cio, uma vez que este é um indicador do momento da ovulação. Nas vacas, este processo tem lugar entre 30-32 h, em média, depois do início do cio. Para a fertilização do oócito e normal desenvolvimento embrionário, é necessário que antes da ovulação, haja uma população de spz previamente capacitados na região do istmo (Baruselli, sem data). Assim sendo, o momento óptimo para a IA será entre as 12 e 24 h após o início do cio. Este procedimento garante que os spz atinjam o local de fertilização algumas horas antes da ovulação (Ball & Peters, 2004d).

Há mais de 50 anos, que se vem aplicando a regra de IA manhã- tarde (AM-PM), enunciada em 1943 por Trimberger & Davies. Isto implica que as vacas observadas em cio durante a manhã sejam inseminadas à tarde ou à noite do mesmo dia e, se as vacas forem observadas em cio durante a tarde ou à noite, sejam inseminadas na manhã seguinte. Este esquema proporciona bons resultados, desde que haja uma eficiente detecção do cio (Cerón, sem data; Noakes et al., 2001c; Gordon, 2004b; Althouse, 2007).

#### **3.1.4.Descongelação da dose de sémen**

Para que sejam obtidos bons resultados, o sémen deve ser descongelado segundo os métodos recomendados pela organização de IA responsável pelo processamento das doses seminais. Os vários centros de IA usam diferentes tipos de diluidores, seguem diferentes ritmos de congelação e utilizam diferentes métodos de processamento, de acordo com o que for mais eficiente para a instituição. Estes factos fazem variar os métodos de maneo do sémen congelado e os tempos e temperaturas de descongelação, consoante o sistema de acondicionamento do sémen (Chagas e Silva, 1985; Nebel, 2007).

O processo padrão de descongelação do sémen acondicionado em palhinhas depende do tipo de palhinha utilizada. Recomenda-se um banho de aquecimento eléctrico e termostaticamente controlado. Em termos gerais, dever-se-á descongelar a dose de sémen em banho-maria à temperatura de 35-37°C, durante 7 segundos (s) para as minipalhinhas e 25s para as palhinhas médias (Chagas e Silva, 2007).

### 3.1.5.Local de deposição do sémen

Não há qualquer dúvida de que a grande maioria dos problemas de fertilidade associados à utilização de sémen congelado, se devem a um maneio impróprio das doses seminais e/ou deficiente deposição do seu conteúdo pelo inseminador. O êxito da IA resulta de uma correcta deposição de sémen de alta qualidade, em local apropriado do aparelho reprodutor de uma fêmea, no momento mais oportuno, de modo a obter-se alto índice de concepção (Chagas e Silva, 1985; Nebel, 2007).

As primeiras inseminações realizadas em fêmeas bovinas limitavam-se à utilização de uma cânula e da deposição vaginal do sémen, de encontro à flor desabrochada. Posteriormente, tentou-se a inseminação cervical com introdução de um espécule esterilizado na vagina. Com o auxílio de um foco luminoso, a cânula de inseminação era guiada através do espécule e introduzida 1-2 cm no canal cervical, local onde se fazia a deposição do sémen (Chagas e Silva, 1985).

Na década de 1940, a inseminação vaginal ou cervical superficial em bovinos foi substituída pela inseminação intrauterina ou cervical profunda, envolvendo a técnica de fixação cervical pelo recto. Este método demonstrou ser mais eficiente e foi rapidamente adoptado como padrão pela indústria de IA bovina (Lopez-Gatius, 1999; Gordon, 2004b).

Uma das fases mais importantes da técnica de inseminação é a deposição do sémen à entrada do corpo do útero. A maioria dos spz depositados por cobrição são perdidos no aparelho reprodutor feminino logo após ejaculação, de modo que o número de spz que atinge o corpo do útero raramente ultrapassa 1% do original. A principal razão pela qual o número de spz pode ser marcadamente inferior por cada dose seminal, é que a principal barreira (o cérvix) ao transporte dos spz, é ultrapassado quando a deposição de sémen na IA é feita correctamente (Lopez-Gatius, 1999; Gordon, 2004b; Nebel, 2007; Morrell, 2011).

Com base no pressuposto de que a deposição de sémen mais perto do local da fertilização (ampola do oviducto) resultaria numa maior fertilidade, o desenvolvimento lógico, imediatamente seguinte, foi tentar a IA intracornual profunda. No entanto, veio a verificar-se que este procedimento tinha pouco efeito sobre o sucesso final da IA. Esta técnica foi proposta pela primeira vez no final de 1950 para melhorar a eficiência da IA, para reduzir o número de spz por dose seminal e otimizar o sémen de touros geneticamente superiores (Lopez-Gatius, 1999; Gordon, 2004b).

Deve notar-se que a IA intracornual exige inseminadores experientes e com conhecimentos profundos sobre a anatomia do aparelho reprodutor feminino, uma vez que há risco acrescido do operador causar lesões ou mesmo perfurar a parede do útero com a extremidade do “*pistole*” ou ainda causar ruptura do folículo pré-ovulatório, no momento da palpação ovárica para determinar o lado da ovulação (Lopez-Gatius, 1999; Noakes et al., 2001c; Gordon, 2004b).



### **3.1.6.Factores que afectam a eficácia da IA**

Num programa de inseminação artificial são vários os factores que podem influenciar o seu sucesso e, na maioria das vezes, encontram-se associados, concorrendo aditivamente para o seu insucesso. Estes factores incluem o produtor, o sémen, o inseminador e a fêmea (vaca) (Chagas e Silva, 1998; Gordon, 2004; Nebel, 2007).

O produtor (proprietário da exploração) representa um elemento fundamental para o sucesso de um programa, uma vez que é responsável por gerir toda a exploração. Tem como obrigações estabelecer um programa sanitário seguro e exigente, assim como um esquema alimentar adequado aos parâmetros produtivos dos seus animais; garantir que a população de animais por parque é adequada ao espaço, de forma a proporcionar conforto e fácil manipulação e condução dos animais, bem como, manter os seus empregados instruídos (por exemplo, a detecção de cios) (Chagas e Silva, 1998).

O sémen utilizado num programa de IA deverá garantir não só a sua excelência no plano genético, mas também uma elevada fertilidade. Isto implica a existência de um sistema eficiente de controlo da qualidade das doses seminais processadas, de forma que o sémen que não obedeça aos padrões mínimos de qualidade seja eliminado (Chagas e Silva, 1998).

O inseminador constitui mais um elemento essencial para o sucesso da IA, uma vez que é responsável por preservar a qualidade do sémen armazenado (respeitando as normas técnicas), bem como de depositar uma população adequada de spz viáveis no local correcto do aparelho reprodutor feminino (à entrada do corpo do útero) em tempo adequado (respeitar a regra AM-PM) (Chagas e Silva, 1998; Gordon 2004b; Nebel, 2007). No entanto, com o tempo, mesmo quando se trata de inseminadores experientes, é frequente adquirirem-se maus hábitos e uma atitude desprendida relativamente ao correcto manejo do sémen congelado e à técnica de inseminação, o que resulta em quebras de fertilidade (Chagas e Silva, 1998).

Por fim, a fêmea pode constituir igualmente um obstáculo. Factores ambientais, alterações hormonais (por exemplo, anestro, quistos ováricos), patologia genital e os agentes patogénicos, associados ou não, todos concorrem efectivamente para contrariar o equilíbrio fisiológico da vaca leiteira (Chagas e Silva, 1998).

### 3.2. ESTRO

A não detecção e/ou detecção incorrecta dos cios leva à falha da inseminação, menores taxas de concepção e, assim, a intervalos entre partos mais longos (Baruselli, sem data).

É provável que o problema mais importante que a indústria de IA bovina enfrenta, até hoje, seja a detecção do cio (Gordon, 1996b). Este problema deve-se em parte, ao aumento da pressão “económica” sobre os produtores que optam por dispendir menos tempo e esforços, na detecção e registos de cios. Porém, também parece ter havido uma diminuição na duração/intensidade dos cios, nos últimos anos (Ball & Peters, 2004e). O balanço energético negativo e o *stress*, têm um efeito supressivo na produção de estradiol pelo folículo dominante. Esta situação pode, por sua vez, afectar a intensidade da manifestação do comportamento do cio e ajudar a explicar o aparente défice do mesmo (Ball & Peters, 2004e).

Existem dois desafios importantes para a detecção do cio: reconhecer com precisão os sinais de estro e identificar todos os períodos possíveis de cio durante a vida reprodutiva do animal (Stevenson, 2005). A capacidade de detecção de cio com eficiência e precisão em vacas e novilhas é susceptível de ter uma profunda influência no desempenho reprodutivo e económico das explorações bovinas leiteiras (Gordon, 1996b). Se uma oportunidade para inseminar uma vaca é perdida por falha de detecção do cio, o intervalo entre partos será prolongado por pelo menos durante mais um ciclo éstrico (ou seja, cerca de 21 dias), a menos que a ovulação seja induzida artificialmente. É assim fácil de perceber que as consequências económicas resultantes da não detecção de um cio são extremamente importantes (Ball & Peters, 2004e).

Por outro lado, pode haver prejuízos ainda maiores se o cio é registado erradamente. Na melhor das hipóteses, o cio erradamente registado pode induzir em erro, a previsão do cio verdadeiro (seguinte). Se, por outro lado, a vaca foi inseminada, contabilizar-se-ão as perdas com a dose seminal, equipamento, tempo e mão-de-obra. Além disso, quando o útero está sob a influência da progesterona, durante a fase lútea, tem menor resposta imunitária, de modo que infecções podem resultar de inseminações inoportunas. Na pior das hipóteses, se a vaca estiver gestante, a inseminação cervical profunda poderá fazê-la abortar (Ball & Peters, 2004e).

Assim, a compreensão das fases do comportamento de cio, dos procedimentos para a sua detecção e o conhecimento de métodos auxiliares de detecção são, portanto, elementos fundamentais para um desempenho reprodutivo eficiente (Ball & Peters, 2004e).

### 3.2.1.Comportamento de cio

As mudanças nos níveis das hormonas circulantes, particularmente do estradiol, resultantes da actividade endócrina do folículo em desenvolvimento, induzem as mudanças comportamentais associadas ao cio. Estas alterações podem ocorrer um a dois dias antes do cio (Ball & Peters, 2004e).

A duração do cio varia entre 4 a 24 horas (h) (Baruselli, sem data). Para o produtor, o melhor indicador de cio é o reflexo de imobilização (RI), ou seja, quando a fêmea permanece imóvel ao ser montada (Hopkins & Evans, 2003; Ax et al., 2004; Ball & Peters, 2004e; O'Connor, 2007).

Por seu turno, existem diversos sinais secundários de cio, que incluem: vulva edemaciada; mucosa vaginal hiperémica; corrimento vaginal mucoso, transparente e elástico; pêlos da base da cauda arrepiados e, eventualmente, com pequenas lesões cutâneas; inquietude; formação de grupos; *flehmen*; lambar; empurrar; lutar; montar outros animais; lordose e possível redução da ingestão de alimentos e/ou da produção de leite (Baruselli, sem data; Gordon, 1996b; Hopkins & Evans, 2003; Ball & Peters, 2004e; O'Connor 2007). Estes sinais podem ocorrer antes, durante ou após o cio e não estão relacionados com o momento da ovulação. Devem ser utilizados como pistas indicadoras de proximidade do cio, para que essas fêmeas possam ser vigiadas com mais cuidado para o registo do RI (O'Connor, 2007) (Figura 10).

É essencial que o produtor ou tratador reservem tempo suficiente para observar as vacas leiteiras em cio. A observação deve ser feita numa base regular cobrindo o dia, em períodos de observação não inferiores a 20-30 minutos (min.) de duração, pois algumas vacas só voltam a ser montadas num espaço de 15-20 min. Há a necessidade de três ou mais períodos de observação, distribuídos por um período de 24 h. De particular importância é o período de observação ao final do dia (20 – 22 h), quando muitas vacas podem apresentar os primeiros sinais de cio, pois nessa altura, os animais geralmente estão livres para desenvolver o comportamento de monta, uma vez que não estão a ser distraídos pela separação de animais, pela ordenha ou alimentação (Gordon, 1996b; Ball & Peters, 2004e). Bons registos são vitais para manter o controlo dos ciclos éstricos normais e para detectar as irregularidades (Ball & Peters, 2004e).

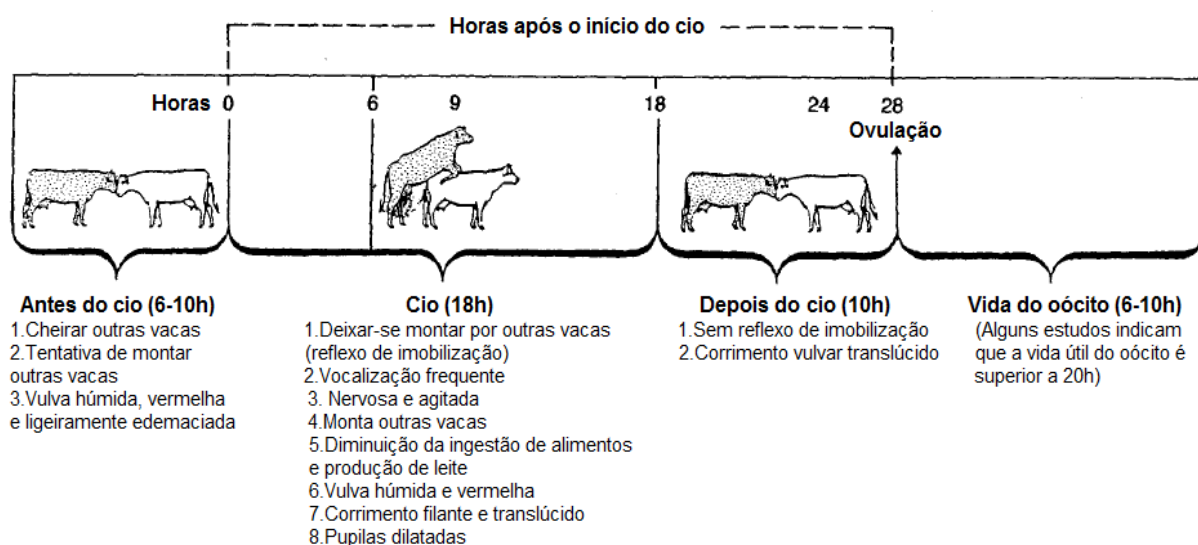
Obviamente que a detecção de cio não será eficaz se a vaca não apresentar sinais claros de que está em cio. Há evidência que uma vaca leiteira pode deixar de manifestar os sinais de cio em resultado de diversos factores, como mau tempo, alimentação pobre, doença (problemas podais, por exemplo), problemas de dominância ou falta de interesse por outras vacas, especialmente se nenhuma está próximo do cio ou mesmo em cio (Gordon, 1996b; Ball & Peters, 2004e).

Do ponto de vista prático é importante dispor de vacas cíclicas alojadas em conjunto e que o grupo seja suficientemente grande para que haja pelo menos dois animais, perto ou mesmo

em cio, em simultâneo. Se o grupo de vacas é pequeno, então pode ser apropriado a utilização de métodos de sincronização de estro para fazer com que as fêmeas entrem em cio em conjunto e, assim, melhorar a sua detecção (Gordon, 1996b).

Deste modo, os principais factores que afectam a intensidade ou a expressão do cio incluem o tamanho do grupo, o número de fêmeas em cio ao mesmo tempo, as instalações de alojamento e as temperaturas ambientais. O treino adequado dos observadores e a frequência de períodos de observação condicionam a eficácia da detecção (Nebel, Walker & McGilliard, 1994).

Figura 10. O Cio em fêmeas bovinas e suas características. Adaptado de Gordon (1996b).



### 3.2.2. Métodos auxiliares de detecção de cio

Para além de uma observação visual de cio precisa e eficiente, da utilização de sistemas de registos precisos e programas de sincronização, estão comercialmente disponíveis uma variedade de métodos auxiliares para a detecção de cio. Estes incluem pinturas da base da cauda, detectores de pressão (visuais-Kamar®, sensores), rufiões, medição de índices de locomoção (podómetro), medição da resistência eléctrica do fluido vaginal, medição da temperatura corporal, doseamento de progesterona e registo de vídeo (circuito interno de televisão) (O'Connor, 2007).

#### 3.2.2.1. Pintura da base da cauda

A pintura da base da cauda (giz, tinta ou spray) é um processo barato e pode ser bastante eficaz quando aplicado nas condições adequadas. Pinta-se uma zona de 20 cm de comprimento por 5 cm de largura ao longo da base da cauda. Ela desaparecerá se esfregada após várias tentativas de monta (Ball & Peters, 2004e; O'Connor, 2007).

No entanto, há o risco de essas marcações serem esfregadas acidentalmente por uma vaca que não se encontra em cio ou apagadas pela chuva. Deste modo, o aspecto da pintura da base da cauda não deve ser o único elemento a ser considerado na determinação da oportunidade da IA (Gordon, 1996b; Ball & Peters, 2004e).

#### 3.2.2.2. Detectores de pressão (visuais - Kamar<sup>®</sup>, sensores)

Estão disponíveis vários tipos de detectores de pressão, todos eles desenvolvidos para registrar a evidência que uma vaca foi montada (Gordon, 1996b), pois a pressão resultante da monta activa o dispositivo (O'Connor, 2007). Estes dispositivos são colados ao pêlo ao longo da linha média na porção cranial à base da cauda (Gordon, 1996b, O'Connor 2007).

Os detectores de pressão visuais (Kamar<sup>®</sup>) dão ao observador uma indicação visual de que a vaca foi montada por uma ou mais companheiras (Ball & Peters, 2004e), uma vez que a pressão exercida durante a monta comprime a tinta presente no reservatório, alterando a cor do dispositivo (Gordon, 1996b). No entanto, há perigo desses detectores serem activados acidentalmente (Ball & Peters, 2004e) ou de se perderem (Baruselli, sem data).

Deste modo, os avanços tecnológicos recentes permitiram que os dispositivos de detecção de pressão se tornassem mais sofisticados (Baruselli, sem data). Um sistema de detecção de cio por radiotelemetria sensível à pressão que monitoriza a frequência e duração das montas está disponível comercialmente para os produtores de leite ou carne (O'Connor, 2007). Quando activado, o transmissor emite um sinal de rádio que é captado por um receptor. O sinal é então digitalizado e armazenado no computador juntamente com a data e hora, duração de cada monta e a identificação da vaca (Baruselli, sem data). Ficou demonstrado que a precisão da detecção do cio deste sistema é semelhante à observação visual do cio, com taxas de 96% e 94%, respectivamente, e a eficiência da detecção aumentou de 51% para a observação visual, para 91%, com este sistema (O'Connor, 2007).

#### 3.2.2.3. Rufiões

A utilização de rufiões pode melhorar a detecção do cio, se esta abordagem for realizada adequadamente e utilizada para complementar a observação visual (O'Connor, 2007).

Neste contexto, rufiões serão todos os animais que revelam interesse por uma vaca que esteja em cio e, assim, ajudam o produtor a identificá-la. Eles serão mais eficazes, se estiverem equipados com um dispositivo "*chin-ball*" para marcação das vacas montadas (Gordon, 1996b; Ball & Peters, 2004e).

Porém, numa base individual, os touros modificados cirurgicamente (vasectomia ou desvio do pénis) e/ou hormonalmente tratados, variam na agressividade sexual. Estes animais, têm ainda potencial para aumentar a actividade sexual do rebanho. Quanto mais animais sexualmente activos coabitarem, mais montas ocorrerão para cada animal em cio (O'Connor, 2007).

A amputação ou o desvio do pénis do touro, para impedir a intromissão, pode ser um processo mais dispendioso do que a vasectomia. No entanto, é preferido porque os touros vasectomizados podem copular e desse modo, disseminar doenças (Ball & Peters, 2004e; O'Connor, 2007). As desvantagens de touros alterados cirurgicamente incluem os custos gerais e o risco de manter um touro, o custo da cirurgia e ainda, as considerações relativas ao bem-estar animal (O'Connor, 2007).

A testosterona provoca o aumento da agressividade sexual quando administrada a um macho castrado, vaca ou novilha. Vacas não lactantes e novilhas ou mesmo novilhas "*freemartin*", são as candidatas preferidas para este tratamento e tendem a ser mais dóceis do que os touros alterados cirurgicamente ou vasectomizados (O'Connor, 2007).

As vacas ninfomaniacas, com quistos foliculares são muito eficazes na detecção de outras fêmeas em cio (Ball & Peters, 2004e).

De um modo geral, o comportamento agressivo e o estabelecimento de situações de favoritismo são as desvantagens deste método auxiliar de detecção do cio (Baruselli, sem data).

Há registos ocasionais de interacção com outras espécies, tais como cavalos e cabras, que foram utilizados para estimular vacas em cio (Ball & Peters, 2004e). No entanto, o cão é a única espécie cujo potencial para a detecção de cio foi seriamente considerado. Vários estudos têm mostrado que é possível que cães treinados para reconhecer o cheiro da urina, possam detectar o cio (Gordon, 1996b; Ball & Peters, 2004e).

#### 3.2.2.4. Medição de índices de locomoção (Podómetros)

Está bem documentado que as vacas são mais activas durante o cio e despendem mais tempo a andar e de pé, do que deitadas (Baruselli, sem data; Gordon, 1996b; O'Connor, 1997; Ball & Peters, 2004e).

Assim, medir a actividade locomotora por meio de podómetros, permite identificar as vacas que estão em cio. Entretanto, a grande diferença na actividade normal de caminhar, entre as diversas vacas, torna difícil estabelecer um limiar confiável, acima do qual as vacas estariam, provavelmente, em cio. As comparações só podem ser feitas para uma vaca individualmente, ao longo do seu ciclo éstrico. Isso exige um programa informático específico, o que aumenta bastante os custos (Baruselli, sem data).

A combinação da observação visual e a utilização de podómetros é uma estratégia altamente eficiente e precisa na detecção do cio (Baruselli, sem data). A massificação desta tecnologia, não tem sido conseguida dado o seu elevado custo inicial e as despesas de manutenção (Gordon, 1996b).

#### 3.2.2.5. Medição da resistência eléctrica do fluido vaginal

Uma série de registos demonstraram que há uma alteração da resistência eléctrica nos fluidos vaginais, no momento do cio e, vários autores sugeriram que isso poderia servir de base técnica de detecção de cio, com recursos ao aparelho de Draminski, equipado com uma sonda intravaginal, capaz de medir essas ditas alterações (Baruselli, sem data; Gordon, 1996b).

A resistência eléctrica dos fluidos vaginais varia consoante a fase do ciclo éstrico e os valores mais baixos, ocorrem por altura do cio (Gordon, 1996b; Ball & Peters, 2004e). Apesar de se aceitar que isso se deva principalmente ao aumento da hidratação do muco cervical, alterações no tipo e/ou quantidade de glicoproteínas e electrólitos podem, também, desempenhar o seu papel (Gordon, 1996b).

Este método exige bons registos individuais de cada vaca relativamente a cios anteriores e, no mínimo duas leituras do cio em análise, para ser confiável. A realização de uma única leitura pode ser enganadora (são fornecidos valores padrão, mas há uma variação individual considerável) (Baruselli, sem data).

Uma vez que é um processo dispendioso e trabalhoso e por ainda, haver outras circunstâncias (doenças, por exemplo) capazes de diminuir a resistência eléctrica dos fluidos vaginais, sugeriu-se que este método auxiliar (Gordon, 1996b; O'Connor, 2007) seria talvez, o menos prático para a detecção de cio (Ball & Peters, 2004e).

#### 3.2.2.6. Medição da temperatura corporal

Há várias décadas que se sabe, que há alterações na temperatura corporal relacionadas com o cio. A temperatura tende a descer, um ou dois dias, antes do cio e, subir novamente, para um pico de curta duração, no dia do cio (Ball & Peters, 2004e).

A monitorização da temperatura corporal, quer isoladamente, quer em conjunto com outras metodologias tem despertado muito interesse dada a facilidade com que pode ser aplicada na exploração. Contudo, de acordo com vários registos, as taxas de cio por monitorização da temperatura raramente excedem os 70-80% e não é incomum que 10-20% de vacas sejam incorrectamente consideradas como estando em cio (Gordon, 1996b).

#### 3.2.2.7. Doseamento de progesterona ( $P_4$ )

As determinações da concentração de progesterona no leite têm sido utilizadas para se aferir se as vacas presentes para a IA estariam de facto em cio (altura em que são basais os níveis periféricos de  $P_4$ ) ou então, para fazer a estimativa de outras fases do ciclo éstrico (Gordon, 1996b).

Antes destes testes estarem comercialmente disponíveis, nem sempre foi fácil decidir se a ausência de cio, em algumas vacas, após o parto, seria devido à ineficaz detecção ou à patologia genital. Os doseamentos de progesterona podem, hoje em dia, ser um meio de

confirmação do reinício da actividade ovária. O desenvolvimento de testes rápidos, baratos e eficazes de medição de progesterona no leite, que podem ser utilizados no campo, aumentou a possibilidade de se recorrer a esta prática, em unidades comerciais. Nas explorações, os doseamentos de progesterona podem ser um meio de evitar a IA em altura incorrecta (Gordon, 1996b).

#### 3.2.2.8.Registo de vídeo (circuito interno de televisão)

Esse método envolve o registo e gravação, por meio de câmaras de vídeo, do comportamento das vacas, em uma área confinada. Exige uma avaliação cuidadosa dos registos e depende da interpretação subjectiva do comportamento dos animais (Baruselli, sem data; Ball & Peters, 2004e).

O custo destes sistemas é cada vez menor e às vezes pode ser justificável quando se tem em conta as melhorias no processo de detecção do cio. Para além disso, também podem ser usados para monitorizar vacas em trabalho de parto e vacas doentes (Gordon, 1996b; Ball & Peters, 2004e).

### 3.2.3.Conclusão

O único sinal comportamental fiável de que uma vaca está em cio é o reflexo de imobilização desencadeado ao ser abordada por outra fêmea ou rufião. Actualmente, meios auxiliares disponíveis para a detecção do cio, não constituem, por si só, alternativas para uma observação visual cuidadosa e frequente, apoiada por bons registos e identificação individual clara. A única alternativa pode ser a inseminação a tempo fixo (IATF), após a sincronização artificial da ovulação ou após o registo da queda da progesterona no leite. A medição de níveis elevados de progesterona podem também servir para evitar a inseminação de uma vaca, o que pode ser especialmente importante, se a vaca estiver gestante (Ball & Peters, 2004e)

A utilização de vários métodos auxiliares de detecção ou a monitorização de dois ou mais aspectos do comportamento de cio é mais eficaz do que um método isolado, para a melhoria da eficiência global do processo. O custo, durabilidade, precisão, vida funcional, requisitos de manutenção, acesso e interpretação dos dados, período de tempo que os dispositivos permanecem no animal e a mão-de-obra, são factores que devem ser considerados na avaliação de qualquer nova tecnologia de detecção de cio (O'Connor, 2007).



#### **4.PROTOCOLOS DE INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E/OU OVULAÇÃO**

#### 4.1.MÉTODOS DE CONTROLO DO ESTRO E/OU OVULAÇÃO

O desempenho reprodutivo tem diminuído ao longo dos últimos 25 anos em explorações leiteiras e a ausência e/ou incorrecta detecção de cio parecem ser as principais razões para o aumento do número de dias abertos (Whisnant, Washburn & Farin, 1999). De acordo com diversos estudos, menos de 50% das vacas leiteiras em lactação são detectadas em cio, o que resulta em intervalos entre inseminações prolongados e menos lucro para o produtor (Portaluppi & Stevenson, 2005). Métodos de sincronização do estro e/ou ovulação, que controlam a função do corpo lúteo e o desenvolvimento das ondas foliculares são cruciais para a eficácia reprodutiva. Assim, a sincronização do estro e/ou da ovulação tem vindo a tornar-se uma ferramenta essencial do manejo reprodutivo para os produtores de leite (Whisnant et al., 1999).

Hoje em dia, existem uma série de programas disponíveis para as explorações leiteiras. Estes sistemas podem variar de nenhuma intervenção hormonal (vacas inseminadas após detecção de cio), baixa intervenção hormonal (restrita a vacas com problemas) ou ainda, alta intervenção hormonal, em que os ciclos reprodutivos são controlados para inseminações programadas (Lucy et al., 2004; Chastant-Maillard, 2006).

As hormonas usadas no controlo farmacológico do ciclo éstrico dos bovinos de leite são semelhantes às produzidas endogenamente no hipotálamo (GnRH), no ovário (estradiol e progesterona) e no útero (PGF<sub>2α</sub>) das vacas. A actividade biológica das hormonas administradas exogenamente é semelhante à das hormonas produzidas endogenamente por uma vaca normal (Lucy et al., 2004).

Foi nos anos 60 que surgiram os primeiros métodos de sincronização do estro à base de administração de progestagénios, com o objectivo de inibir a ovulação. Embora proporcionassem uma sincronização aceitável, as taxas de concepção eram baixas. Subsequentemente, a descoberta da prostaglandina F<sub>2α</sub>, a hormona luteolítica produzida pelo útero, levou ao desenvolvimento de novos métodos de sincronização, nos anos 70, com a vantagem de se associar prostaglandinas aos progestagénios. Apesar desta associação ter revelado melhorias na sincronização do estro, as taxas de concepção continuavam a ser bastante baixas, especialmente após tratamentos prolongados com progestagénios. Uma melhor compreensão da dinâmica folicular, nos anos 90, revelou que o folículo dominante persistente era o agente causal desta baixa fertilidade (Lucy et al., 2004). Assim, novos avanços revelaram que era possível controlar as ondas foliculares com o recurso à hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH). Hoje em dia, progestagénios, prostaglandinas e hormona libertadora de gonadotrofinas têm sido usadas em associação para melhorar o controlo do estro e da ovulação (Johnson, 2005; Chastant-Maillard, 2006). Uma vez que a administração de estrogéneos em bovinos de leite e de carne foi proibida na União Europeia desde 14 de Outubro de 2006 (Directiva 0/3/74/CE que altera a directiva

anterior de 96722/CE), esta hormona não faz parte dos programas europeus de controlo farmacológico do ciclo éstrico (Lane et al., 2008).

Os principais objectivos de programas de sincronização do estro e/ou ovulação são (Lucy et al., 2004):

- Controlar o desenvolvimento da onda folicular;
- Promover a ovulação em vacas em anestro;
- Induzir a regressão do corpo lúteo em vacas cíclicas;
- Sincronizar o estro e/ou ovulação no final do tratamento;
- Limitar períodos de observação do cio para a execução das IA em tempo correcto.

Os protocolos de manipulação do estro e/ou ovulação podem ser agrupados em dois tipos principais: os que sincronizam o estro e os que sincronizam a ovulação. Os protocolos de sincronização do estro requerem a detecção do cio. Embora, tendam a apresentar uma maior concentração dos animais que evidenciam o comportamento de cio, o seu sucesso continua dependente da eficiência da detecção de cios na exploração (Santos, Galvão, Ronaldo, Cerri & Juchem, 2003). Os protocolos de sincronização da ovulação permitem a inseminação num momento pré-determinado e prescindem da detecção do cio. Este tipo de protocolos tem por finalidade controlar a onda de desenvolvimento folicular e, por consequência, a ovulação (Pursley, Mee & Wiltbank, 1995).

Um protocolo de sincronização ideal deve proporcionar um início do estro preciso e uma fertilidade muito próxima da obtida em ciclos éstricos não manipulados, com taxas de gestação superiores a 55% após uma única IA (Austin, Mihm, Ryan, Williams & Roche, 1999). Em alguns casos, os sistemas de manipulação do estro podem ser usados como tratamentos para certas doenças reprodutivas, tais como ovulações silenciosas ou doença ovárica quística (Baruselli, sem data).

O ciclo éstrico pode ser manipulado de três formas (Ball & Peters, 2004f; Lucy et al., 2004):

- Indução artificial da luteólise, por utilização de um agente luteolítico ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ). No entanto, só será eficaz em vacas cíclicas, com um corpo lúteo sensível;
- Pelo uso de progestagénios, que criam uma fase lútea “artificial”. Este método também é eficaz para a indução da ovulação, em vacas em anestro;
- Através do uso sequencial de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e análogos de GnRH, para obter o desenvolvimento folicular sincronizado após a indução de luteólise.

Contudo, é preciso ter em mente que cuidados como, o bem-estar e conforto dos animais durante um programa de controlo do ciclo éstrico, boa alimentação, inseminações bem organizadas e precisas, manutenção de registos actualizados, estão entre os factores mais importantes para a obtenção de bons resultados (Gordon, 1996c).

## 4.2.PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO

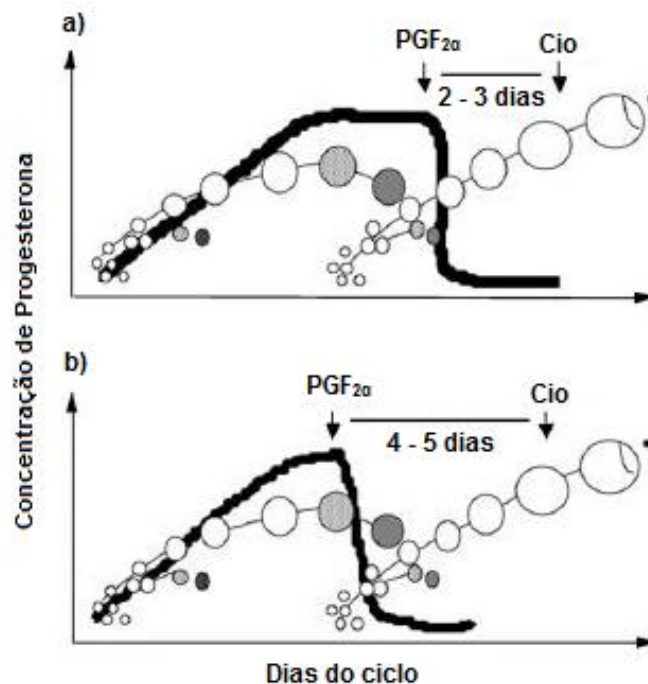
### 4.2.1.Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ( $PGF_{2\alpha}$ )

Os primeiros relatos do uso de  $PGF_{2\alpha}$  no controlo do ciclo éstrico, como um agente luteolítico em bovinos datam do início de 1970 (Gordon, 1996c), dada a sua capacidade para induzir a regressão do corpo lúteo e, por consequência, estimular o desenvolvimento de uma nova onda folicular ovulatória e a sincronização do estro (Cavalieri et al., 2006). Deste então um certo número de diferentes protocolos têm sido desenvolvidos para o uso de  $PGF_{2\alpha}$  em programas de reprodução. Estas variantes incluem diferentes números de administrações e de intervalos de tempo entre as administrações de  $PGF_{2\alpha}$  (Whisnant et al., 1999).

A eficácia da  $PGF_{2\alpha}$  para induzir o estro está dependente da presença de um CL responsivo. Isto só se verifica entre os dias 5 a 17 (novilhas) e 7 a 17 (vacas) do ciclo éstrico. No entanto, a resposta é mais elevada, mediana ou baixa, no final (dias 14-19, 95,7% - 202/211), meio (dias 10-13, 86,4% - 291/337) ou no início (dias 5-9; 76,9% - 173/225) do ciclo éstrico, respectivamente (Cavalieri et al., 2006).

A aplicação de uma única dose luteolítica de prostaglandinas obriga à identificação das vacas que apresentam um CL maduro no ovário, o que consequentemente acarreta custos acrescidos, e os resultados dependem da precisão da detecção de corpo lúteo por palpação ou ultrassonografia transrectal (Ball & Peters, 2004f; Allcock & Peters, 2008). Uma vez que a  $PGF_{2\alpha}$  não tem qualquer efeito sobre os folículos em desenvolvimento, nem qualquer forma de controlo sobre a onda de folículos emergente, as vacas num protocolo deste tipo entram em cio em diferentes dias após a sua administração, resultando na deficiente precisão sobre o momento da inseminação ou ovulação (Santos et al., 2003; Cavalieri et al., 2006; Chastant-Maillard, 2006; Lane et al., 2008). O tempo entre a administração de  $PGF_{2\alpha}$  e a ovulação depende do estado do desenvolvimento folicular, no momento do tratamento. Vacas com folículos maduros no momento da luteólise entram em cio mais cedo do que as vacas com folículos imaturos (Baruselli, sem data; Cavalieri et al., 2006; Lane et al., 2008), isto é, se estiver presente um folículo dominante funcional no momento da injeção da  $PGF_{2\alpha}$ , os animais entrarão em cio no espaço de 2-3 dias. Porém, se as fêmeas se encontrarem numa fase de pré-dominância da onda folicular será necessário um período adicional de 2 a 4 dias para que um folículo se torne dominante, o que alonga e torna mais variável aquele intervalo de tempo (Baruselli, sem data; Lucy et al., 2004) (Figura 11).

Figura 11. Efeito do estado de desenvolvimento folicular sobre o tempo entre a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e a exibição do cio, em bovinos. Adaptado de Lane et al. (2008).



Legenda: Em (a) fêmeas que receberam a injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  após a seleção do folículo dominante e em (b) fêmeas que receberam a injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no momento do surgimento de uma nova onda folicular.

Na tentativa de ultrapassar este inconveniente, foi desenvolvido um protocolo que consiste em duas administrações de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , realizadas a intervalos de 7, 11 ou 14 dias (Folman, Kaim, Herz & Rosenberg, 1990; Lucy et al., 2004; Cavalieri et al., 2006). Esse intervalo é relativo ao período de tempo necessário após a primeira injeção, para que as fêmeas que responderam à primeira injeção (indução da regressão do seu CL e exibição de cio) tenham um novo CL suficientemente desenvolvido para responder à segunda injeção (pelo menos, no dia 7 do ciclo éstrico). Por outro lado, as fêmeas que se encontram na fase folicular (sem CL maduro) à primeira injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , terão tempo para apresentar um CL sensível quando à segunda injeção é administrada (Stevenson, 2005).

O protocolo conhecido como “Método dois mais dois” foi proposto para sincronizar grupos de animais cíclicos, em diversas fases do ciclo éstrico: todas as vacas recebem uma injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no primeiro dia de tratamento e uma segunda injeção 11 a 14 dias mais tarde; em seguida, realizam-se as IA três e quatro dias mais tarde (72 e 96h, após a segunda injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ). Alternativamente, as vacas podem ser inseminadas após observação do cio (Ball & Peters, 2004f; Allcock & Peters, 2008). Uma modificação deste protocolo é conhecida por “Método um e meio”: as vacas recebem a primeira injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e as que manifestarem cio são inseminadas, e as que não apresentarem cio,

recebem a segunda injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , 11 a 14 dias mais tarde e podem ser inseminadas em horário fixo ou após detecção do cio. Embora exija um esforço adicional em termos de detecção de cio, este processo tende a proporcionar melhores resultados do que o “Método dois mais dois”. No entanto, a sua principal vantagem é a redução do custo (menos administrações de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e menos IA) (Ball & Peters, 2004f; Allcock & Peters, 2008).

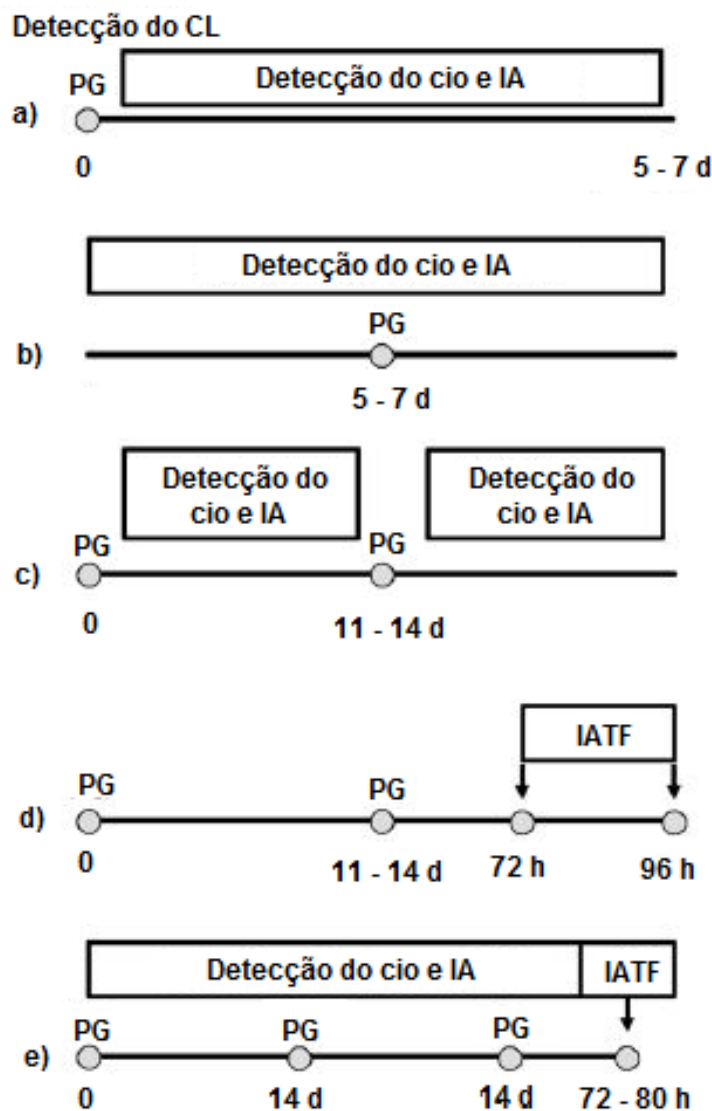
Alguns autores aconselham a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  antes do final do período voluntário de espera (PVE) de modo a melhorar o desempenho reprodutivo das vacas e reduzir o número de dias em aberto (Stevenson, 2001; Santos et al., 2003). Stevenson (2001) recomenda a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  14 dias antes do fim do PVE. Este autor não aconselha a inseminação das vacas após a primeira administração, ainda que mais de 50% das vacas exibam cio em resposta à primeira administração. A segunda administração, a ser realizada no final do PVE, possibilita a ocorrência do primeiro serviço numa altura em que as vacas já são elegíveis para a IA.

Posteriormente, foi desenvolvido um outro protocolo de sincronização para vacas em lactação em que são administradas três injeções de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Neste protocolo, conhecido como *Targeted Breeding*, os animais são sistematicamente tratados nos mesmos dias da semana (geralmente numa segunda-feira), para facilitar o tratamento e a IA durante a semana (Baruselli, sem data; Cavalieri et al., 2006). Todos os animais que não forem detectados em cio após a primeira ou segunda administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  com um intervalo de 14 dias, são tratados com uma terceira injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  14 dias depois, sendo a IA realizada após detecção do cio ou às 72 a 80 h (Stevenson, 2001; Stevenson, 2005; Cavalieri et al., 2006). No entanto, a realização da IATF neste protocolo não resulta em taxas de gestação aceitáveis devido ao inconsistente desenvolvimento folicular e ovulação (Nebel et al., 1994). Nos trabalhos de Nebel et al. (1994), a taxa de não retorno aos 75 dias foi de cerca de 36% quando as vacas foram inseminadas após o tratamento com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sem detecção de cio, em contraste com uma taxa de não retorno de 63,4% quando foram inseminadas com base na detecção de cio.

Alguns dos protocolos baseados no uso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  para a sincronização do estro em bovinos estão apresentados na Figura 12.

Apesar de os tratamentos com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  poderem ser realizados facilmente e sem causar grande *stress* aos animais, temos que ter em conta que, se inadvertidamente administrada a fêmeas gestantes, este fármaco pode vir a ser um abortivo altamente eficaz nas doses utilizadas para o controlo do estro (Gordon, 1996c).

Figura 12. Representação esquemática de protocolos baseados no uso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  para a sincronização do estro em bovinos. Adaptado de Cavalieri et al. (2006).



Legenda: (a)  $\text{PGF}_{2\alpha}$  administrada apenas às vacas com um CL e, detecção do estro e IA são realizados nos 5 a 7 dias seguintes; (b) Detecção do cio e IA realizada nos primeiros 5 a 7 dias, a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  é depois administrada às vacas que não evidenciaram cio; nova detecção do estro e IA por outros 5 a 7 dias; (c) "Método um e meio": administração de 1 dose de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e os animais que exibem cio são inseminados, os que não exibiram cio recebem uma 2ª dose de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  11 a 14 dias mais tarde e são inseminados por ocasião da detecção do cio; (d) "Método dois mais dois": planeia-se a realização da IA para 72 e 96 h após uma estratégia de duas doses de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ; (e) Programa *Targeted Breeding*: administração de duas  $\text{PGF}_{2\alpha}$  com intervalo de 14 dias, a detecção do cio e IA devem ser realizadas ao longo do programa. A IA das vacas não detectadas em cio pode ser realizada 72 a 80 h após a 3ª dose de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

#### 4.2.2. Progesterona (P<sub>4</sub>)

Este método de controlo do ciclo éstrico consiste em simular a função do corpo lúteo por meio da administração de progesterona ou de um progestagénio. Assim, a libertação de gonadotrofinas é inibida e, com isso, a maturação do folículo ovárico é suprimida até à remoção do bloqueio progesterónico (Ball & Peters, 2004f; Allcock & Peters, 2008).

Protocolos baseados em progesterona para a sincronização de estro têm vindo a evoluir desde os tratamentos de longa duração, que foram os primeiros a serem usados no controlo do ciclo éstrico em bovinos. As modificações dos protocolos incluíram diferenças na via de administração, na duração do tratamento, nos métodos para controlar o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório e evitar a persistência do folículo dominante e, nas associações terapêuticas pós-progesterona para melhorar a sincronização do estro e da ovulação (Cavalieri et al., 2006).

A progesterona pode ser administrada por via oral, por via intramuscular, por via subcutânea (implantes auriculares) ou através de dispositivos intravaginais (Jánudeen, Wahid & Hafez, 2004; Allcock & Peters, 2008). Contudo, em consequência da legislação comunitária, apenas os dispositivos intravaginais são passíveis de serem utilizados em Portugal.

Os dispositivos intravaginais variam na forma, desenho e na quantidade de P<sub>4</sub> que está impregnada no dispositivo, sendo os mais comuns o PRID (*Progesterone-releasing intravaginal device*) e o CIDR (*Controlled internal drug release*), que contêm P<sub>4</sub> para a sincronização do estro e indução da ciclicidade nas vacas (Cavalieri et al., 2006). O PRID é um dispositivo em forma de espiral e contém 1,55 g de progesterona, enquanto o CIDR é um dispositivo em forma de Y e contém 1,38 g de progesterona (Gordon, 1996c; Whisnant et al., 1999; Ball & Peters, 2004f; Allcock & Peters, 2008).

Diversos autores sugerem que o CIDR pode ser mais fácil de inserir e remover do que os outros dispositivos intravaginais. Para ambos, o PRID e o CIDR, as perdas não devem exceder os 5%, se forem inseridos correctamente. Ambos os dispositivos podem revelar inesperadamente, perdas elevadas (> 10%) em bovinos estabulados. Parecem ser as companheiras, as responsáveis por muitas das remoções prematuras. Como relatado por Broadbent et al. (1993), citados por Gordon (1996c), o CIDR tem melhores taxas de retenção do que o PRID, tanto em novilhas como em vacas. Na Irlanda, Ryan (1994), citado por Gordon (1996c), referiu que a taxa de perda do CIDR (3,5%) foi inferior à do PRID e que com aquele, a taxa de vaginites (observada como uma descarga purulenta após a remoção do dispositivo intravaginal) também foi menor.

Uma das vantagens da utilização destes dispositivos intravaginais é que são indicados na sincronização de novilhas e de vacas no pós-parto, especialmente para aquelas que revelaram problemas no reinício da actividade ovárica, sendo considerado o tratamento de eleição para animais em anestro (Lane et al., 2008). Outra vantagem é o tratamento de quistos ováricos. O recurso à progesterona faz diminuir a frequência pulsátil de LH em vacas



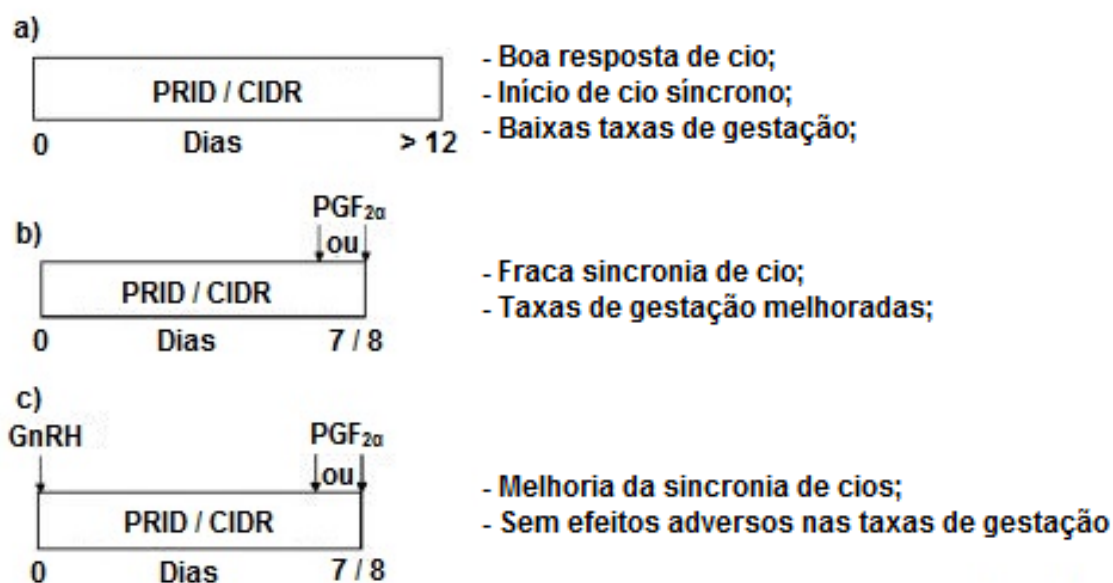
quísticas. A diminuição dos pulsos de LH após o tratamento com progesterona é seguida pela substituição do folículo quístico por uma nova onda folicular. O desenvolvimento de um novo FD é normal e a ovulação ocorrerá após a suspensão da progesterona (Lucy et al., 2004).

Embora ainda não disponível em Portugal, surgiu recentemente no mercado um outro dispositivo intravaginal de plástico, em cujo interior é possível encaixar uma matriz de silicone com 1,56g de progesterona (Cute-Mate®, da empresa *Bioniche Animal Health*). Neste modelo, a progesterona é colocada no dispositivo antes de ser introduzido no animal, apresentando a vantagem adicional de permitir a reutilização da haste após a lavagem com um desinfectante (Cavaliere et al., 2006).

Os tratamentos de longa duração com progesterona (> 12 dias) e os iniciados no final do ciclo éstrico proporcionam uma elevada taxa de exibição de cios, mas a fertilidade é, normalmente, baixa. Isto ocorre porque os actuais sistemas de administração de progesterona exógena não imitam a supressão dos pulsos de LH da mesma maneira que o CL. Na ausência deste, tais tratamentos permitem que a frequência de pulsos de LH atinga um valor intermédio, prolongando assim o crescimento do folículo dominante (folículo persistente) e, daí, as reduzidas taxas de gestação. A incorporação da PGF<sub>2α</sub>, como agente luteolítico, permite que a duração do tratamento P<sub>4</sub> seja reduzida para um período de 7 a 10 dias. A PGF<sub>2α</sub> é mais eficaz na sincronização do estro se for administrada 1 a 2 dias antes do fim do tratamento, do que no final do mesmo. Ao reduzir-se a duração do tratamento com P<sub>4</sub> com a associação de um agente luteolítico, melhora-se a taxa de gestação, mas a taxa de exibição de cio diminui (Lane et al., 2008).

O protocolo de tratamento mais comum consiste na inserção do CIDR ou PRID por 7 dias associado à administração de PGF<sub>2α</sub> ao dia 6 ou 7. Este protocolo pode ser melhorado com a administração de GnRH na altura da inserção do CIDR, com o objectivo de favorecer o recrutamento de uma nova onda folicular (Santos et al., 2003) (Figura 13).

Figura 13. Representação esquemática de diferentes opções de controlo do ciclo éstrico à base de progesterona. Adaptado de Lane et al. (2008).



Legenda: (a) Tratamento de P<sub>4</sub> de longa duração (> 12 dias); (b) Tratamento de P<sub>4</sub> de curta duração associado a uma dose PGF<sub>2α</sub> no final do tratamento; (c) Tratamento de P<sub>4</sub> de curta duração associado a uma dose GnRH no início do tratamento e a uma dose de PGF<sub>2α</sub> no final do tratamento.

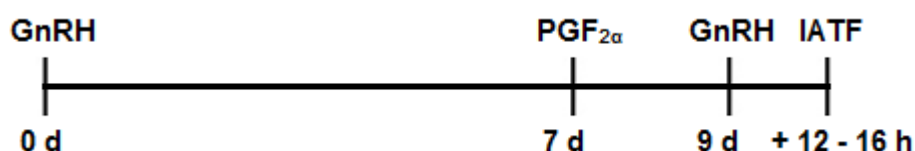
### 4.3.PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

#### 4.3.1.Protocolo Ovsynch

O protocolo Ovsynch foi apresentado por Pursley e seus colaboradores, em 1994 (Lucy, 2007). Foram tratadas novilhas e vacas e os resultados foram animadores com as vacas. Em 1995, Pursley et al. referiram que a ovulação, em vacas leiteiras, poderia ser sincronizada dentro de um período de 8h (24-32h após a segunda administração de GnRH) (Pursley et al., 1997b; Pursley, Silcox & Wiltbank, 1998). Este protocolo demonstrava poder ter um impacto significativo na gestão da reprodução de vacas leiteiras, uma vez que permitia que a IA fosse realizada em tempo fixo, sem a necessidade da detecção de cio (Pursley et al., 1995). Os objectivos originais da investigação do Ovsynch eram: (1) controlar hormonalmente o aparecimento de uma nova onda folicular; (2) controlar o tempo de vida dos CL espontâneo e induzido; e (3) controlar o tempo da ovulação do folículo dominante. Foram necessárias três administrações hormonais para a concretização destes três objectivos (Pursley & Bello, 2007).

Deste modo, o protocolo Ovsynch consiste na administração de GnRH ou de seus análogos numa fase aleatória do ciclo éstrico (Pursley et al., 1995; Santos et al., 2003). Esta primeira administração induz a ovulação ou a luteinização do folículo dominante (dependendo da fase do ciclo éstrico em que a vaca se encontra), sincroniza a onda de folículos emergente e controla o estado de desenvolvimento do folículo pré-ovulatório antes da administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , que é realizada 7 dias depois da administração de GnRH (Pursley et al., 1995; Pursley & Bello, 2007). A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induz a regressão do corpo lúteo original e/ou do corpo lúteo induzido (Pursley et al., 1995; Thatcher et al., 2006). Uma segunda administração de GnRH é realizada 48h mais tarde para induzir um pico pré-ovulatório de LH e a ovulação subsequente do folículo dominante, no espaço de 24 a 32 horas (Peters et al., 1999; Pursley & Bello, 2007). A inseminação a tempo fixo, irá ocorrer 12 a 16 horas mais tarde, no dia 10 após a primeira administração de GnRH (Pursley et al., 1998; Chastant-Maillard, 2006) (Figura 14).

Figura 14. Representação esquemática do protocolo Ovsynch. Original da autora.



Este protocolo apenas permite resultados satisfatórios em vacas cíclicas, com uma taxa de gestação global que ronda os 22 a 53%. A sua maior desvantagem é a baixa taxa de concepção. Assim sendo, não deve ser usado em novilhas nem em vacas acíclicas, uma vez que reduz ainda mais as taxas de concepção (Chastant-Maillard, 2006). Contudo, as vacas tratadas com Ovsynch revelaram taxas de concepção semelhantes às obtidas em vacas inseminadas após a detecção de cio (37% versus 39%, respectivamente) (Pursley et al., 1997b).

Têm sido propostas algumas alterações a este protocolo, com um intervalo de tempo diferente entre a administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e a segunda injeção de GnRH, ou do tempo entre a segunda injeção de GnRH e a IA (Pursley et al., 1998; Peters e Pursley, 2003).

Os trabalhos de Peters e Pursley (2003) revelaram que a redução do tempo entre a injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e a segunda injeção de GnRH se traduzia numa redução da fertilidade, associada a uma elevada frequência de fases lúteas curtas, pelo que recomendaram a administração de GnRH, num período mínimo de 36 horas, após a administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Outros trabalhos de Pursley et al. (1998), em que foi avaliada a fertilidade de animais tratados com intervalos de tempo diferentes entre a 2ª administração de GnRH e a IA (0h, 8h, 16h, 24h e 32h), revelaram que o intervalo de 16 horas foi o que apresentou melhores

resultados. A partir das 24 horas, a fertilidade decresce muito rapidamente, pelo que se deverá ter a preocupação de inseminar antes disso.

O custo do protocolo Ovsynch resulta maioritariamente das duas doses de GnRH que são administradas durante este protocolo. Desde modo, uma forma de reduzir os custos deste protocolo, seria reduzir as doses das duas administrações de GnRH. Fricke, Guenther e Wiltbank (1998) relataram que a dose de GnRH poderia ser reduzida de 100 microgramas ( $\mu\text{g}$ ) para 50  $\mu\text{g}$ , em ambas as injeções, sem que a taxa de gestação fosse afectada.

Este protocolo tem sido implementado com sucesso em várias explorações de vacas leiteiras como estratégia para a IA durante o primeiro serviço pós-parto, assim como para a reinseminação das vacas que não ficaram gestantes (Santos et al., 2003).

#### **4.3.2.Modificações ao protocolo Ovsynch**

O protocolo Ovsynch foi modificado numa variedade de formas a partir do seu modelo original. Essas modificações destinaram-se a diminuir o número de manipulações por animal ou a melhorar a resposta global ao programa (Lucy, 2007).

##### **4.3.2.1.Pré-sincronização (Protocolo Presynch)**

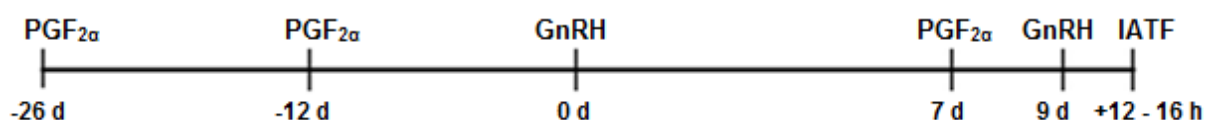
A principal limitação do protocolo Ovsynch é a grande variabilidade na taxa de sincronização, definido neste protocolo pela regressão do CL e a indução da ovulação em resposta à 2ª GnRH. Aproximadamente 10 a 30 % das vacas não são sincronizadas. É provável que as vacas não sincronizadas sejam inseminadas num momento inadequado relativamente à ovulação, diminuindo assim as suas possibilidades de gestação (Pursley & Bello, 2007). Parte desta variação da taxa de sincronização deve-se à fase do ciclo éstrico em que o protocolo Ovsynch é iniciado (Vasconcelos, Silcox, Rosa, Pursley & Wiltbank, 1999). Estes autores verificaram que quando as vacas iniciavam o protocolo Ovsynch entre os dias 5 a 12 do ciclo éstrico, as taxas de concepção tendiam a ser mais elevadas do que em outras fases do ciclo éstrico (Tabela 4). As principais causas de insucesso de sincronização quando este protocolo de Ovsynch é iniciado em outras fases do ciclo éstrico são: (1) ausência de resposta ovulatória à primeira dose de GnRH, (2) atresia do FD antes da administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e (3) luteólise espontânea entre a administração da primeira dose de GnRH e a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Pursley & Bello, 2007).

Tabela 4. Eficácia do protocolo Ovsynch, quando iniciado em diferentes dias do ciclo éstrico. Adaptado de Vasconcelos et al. (1999).

Dias do ciclo éstrico	Ovulação na 1ª injecção de GnRH	Ovulação na 2ª Injecção de GnRH
1 – 4	23%	94%
5 – 9	96%	89%
10 – 16	54%	85%
17 – 21	77%	81%
Geral	64%	87%

Uma estratégia para que o início do protocolo Ovsynch coincida com a fase mais favorável do ciclo éstrico é a pré-sincronização do ciclo éstrico antes da primeira administração da GnRH (Moreira et al., 2001; El-Zarkouny, Cartmill, Hensley & Stevenson, 2004). Moreira et al. (2001) conceberam um protocolo de pré-sincronização (Presynch), para optimização do Ovsynch, através da administração de duas injecções de PGF<sub>2α</sub> com 14 dias de intervalo, com a segunda injecção de PGF<sub>2α</sub> a ser administrada 12 dias antes da primeira injecção de GnRH do protocolo Ovsynch (Figura 15). Mais de 70% das vacas iniciaram este último protocolo, durante o início do diestro (dia 5 a 12 do ciclo éstrico), quando o Presynch foi aplicado antes do Ovsynch, comparativamente às 53% fêmeas tratadas com Ovsynch em fases aleatórias do ciclo éstrico (El-Zarkount et al., 2004).

Figura 15. Representação esquemática do protocolo Presynch. Original da autora.



Foi demonstrado que a pré-sincronização das vacas de leite com duas administrações de PGF<sub>2α</sub>, intervaladas de 12 a 14 dias, antes do início do Ovsynch, pode elevar de forma significativa, em mais de 10 pontos percentuais, a taxa de gestação (Moreira et al., 2001; Navanukraw et al., 2004). Este facto pode justificar os encargos acrescidos com tempo, mão-de-obra e fármacos (Navanukraw et al., 2004).

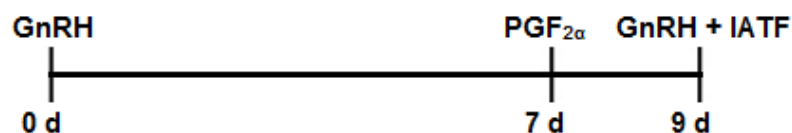
A pré-sincronização em vacas cíclicas pode melhorar a fertilidade por IATF ao primeiro serviço, através de três mecanismos: (1) optimização do estado de saúde do aparelho reprodutor; (2) aumento do número de estros antes da IA; ou (3) diminuição da taxa de morte embrionária (Moreira et al., 2001; El-Zarkouny et al., 2004; Stevenson, 2005 Cavalieri et al., 2006).

Os protocolos de pré-sincronização só serão eficientes em vacas que já tenham recuperado a ciclicidade. No entanto, o sucesso dos protocolos de pré-sincronização com IATF para o primeiro serviço varia de exploração para exploração, dependendo do grau de anestro e da qualidade de execução da sequência dos tratamentos (Lucy et al., 2004).

#### 4.3.2.2.Co-sincronização (Protocolo Cosynch)

Uma das modificações mais simples do protocolo Ovsynch clássico é o denominado Cosynch. Neste protocolo, tanto a segunda injeção de GnRH como a IA são realizadas ao mesmo tempo, ou seja, 48 horas após a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Geary e Whittier, 1998; Lane et al., 2008) (Figura 16).

Figura 16. Representação esquemática do protocolo Cosynch. Original da autora.



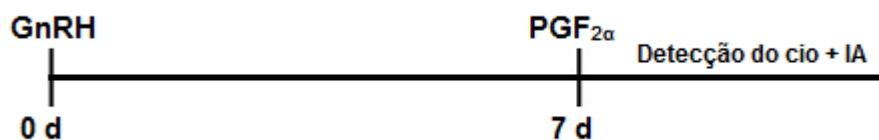
Este protocolo apresenta como principal vantagem o facto de reduzir o número de manipulações por animal (Baruselli, sem data). No entanto, apresenta uma taxa de concepção mais baixa quando comparado com o protocolo Ovsynch (ou seja, IA em tempo fixo entre às 16 a 24h da 2ª GnRH) (Geary e Whittier, 1998). Para tentar contornar este inconveniente, o momento da segunda administração de GnRH foi investigado por Portaluppi & Stvenson (2005) que relataram ter havido uma melhoria da taxa de gestação quando a inseminação coincidiu com a administração de GnRH às 72h (31%) após a administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , relativamente às 48h (23%). No entanto, num outro estudo realizado por Sterry et al. (2007), citados por Lane et al. (2008), não foram encontradas diferenças entre os dois modelos de tratamentos.

A utilização deste protocolo não deve ser recomendada em explorações modelo, com boa detecção de cio e altas taxas de submissão, uma vez que a sua taxa de concepção após IATF tender a ser baixa (Lane et al., 2008).

#### 4.3.2.3. Sincronização selectiva (Protocolo Selectsynch)

O protocolo Selectsynch também é um protocolo Ovsynch modificado, em que a administração de GnRH é seguida, 7 dias mais tarde, pela administração de uma dose luteolítica de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , com IA após a detecção de cio (Rabiee et al., 2005) (Figura 17).

Figura 17. Representação esquemática do protocolo Selectsynch. Original da autora.

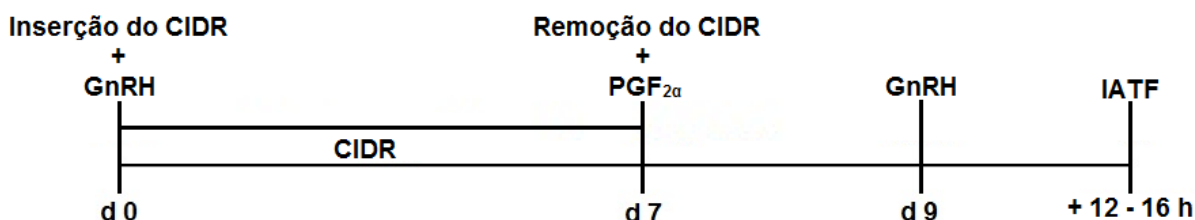


Este protocolo pode produzir uma taxa de concepção semelhante ao protocolo Ovsynch. No entanto, como há uma dependência da detecção do estro, apresenta uma desvantagem prática relativamente ao programa Ovsynch (Rabiee et al., 2005). Tem como vantagens a diminuição dos custos hormonais, uma vez que há menos uma administração de GnRH, e há uma redução do número de manipulações por animal.

#### 4.3.2.4. Protocolo Ovsynch associado à progesterona (Ovsynch + CIDR)

Muitos trabalhos têm investigado a associação de progesterona ao protocolo Ovsynch. Para este fim, um dispositivo intravaginal (CIDR) é inserido na fêmea em simultâneo com a primeira injeção de GnRH do protocolo Ovsynch e é mantido no local, geralmente por 7 dias, quando é administrada a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Lane et al., 2008) (Figura 18).

Figura 18. Representação esquemática do protocolo Ovsynch + CIDR. Original da autora.



El-Zarkouny et al. (2004) relataram melhorias na taxa de gestação aos 29 dias, numa exploração, quando o CIDR foi incluído no protocolo Ovsynch (59%), em comparação com o Ovsynch clássico (36%). Resultados similares foram também registados por Stevenson et al. (2006), que obtiveram um aumento da taxa de gestação aos 28 dias quando compararam ambos protocolos. Essa melhoria poderá ser atribuída ao facto de a suplementação

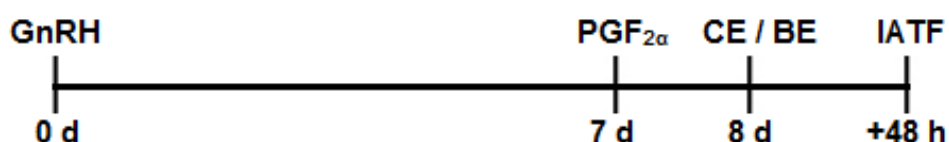
progesterónica entre a primeira dose de GnRH e a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , impedir que ocorra um estro precoce e uma ovulação prematura, por luteólise espontânea, numa pequena percentagem de vacas cíclicas, cujo FD não é sensível à primeira dose de GnRH (El-Zarkouny et al., 2004; Lucy et al., 2004; Chastant-Maillard, 2006; Wiltbank, Lopez, Sartori, Sangsritavong & Gümen, 2006).

Uma vantagem adicional desta associação  $\text{P}_4$  + Ovsynch é que 87% das vacas revelaram uma fase lútea normal após a inseminação, em comparação com 71% das vacas que apenas foram tratadas com GnRH (El-Zarkouny et al., 2004). Para além disso, num grande estudo com vacas leiteiras em produção, realizado por Pursley et al. (2001), citados por El-Zarkouny et al. (2004), o uso de CIDR em simultâneo com o protocolo Ovsynch melhorou a taxa de gestação, especialmente em vacas anéstricas.

#### 4.3.2.5. Protocolo Heatsynch

O protocolo Heatsynch envolve a substituição da segunda injeção de GnRH do protocolo Ovsynch por ésteres de estradiol (cipionato ou benzoato de estradiol) (Baruselli, sem data). Assim, este protocolo combina uma administração de um éster de estradiol 24h após a administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , sendo a IATF realizada 48h depois (Cavalieri et al., 2006; Lane et al., 2008) (Figura 19).

Figura 19. Representação esquemática do protocolo Heatsynch. Original da autora.



Legenda: Cipionato de estradiol (CE); Benzoato de estradiol (BE).

Thatcher et al. (2002), citados por Cavalieri et al. (2006), referiram que a utilização de ésteres de estradiol resultou num pico de LH de duração mais longa do que o originado pela GnRH, num maior tónus uterino, mais vacas detectadas em cio, maior facilidade de inseminação e custo reduzido.

No entanto, a taxa de gestação não apresentou diferenças entre os protocolos Ovsynch e Heatsynch [37% vs 35% (novilhas); 28% vs 29% (vacas)]. A substituição de GnRH por um éster de estradiol não parece afectar negativamente a eficiência reprodutiva. Convém, no entanto, sublinhar que o uso de estrogéneos é proibido em países da União Europeia e, em animais cujos os produtos são importados pelos Estados-Membros (Lane et al., 2008).

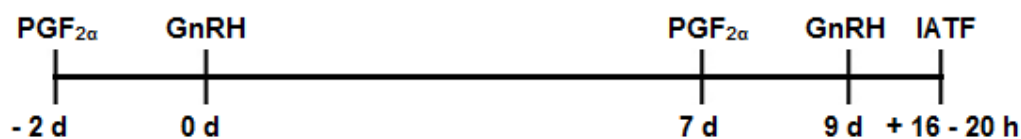


#### 4.3.2.6. Protocolo Doublesynch

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para minimizar a proporção de vacas em fases menos favoráveis ao início do protocolo Ovsynch. Investigadores que tentaram a pré-sincronização, com a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  7 dias antes do protocolo Ovsynch, verificaram não haver qualquer efeito sobre a taxa de gestação. Uma outra abordagem, já anteriormente mencionada, consiste em tratar as vacas com duas injeções de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  com um intervalo de 14 dias entre elas e com a segunda injeção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a ser administrada 12 dias antes da primeira injeção de GnRH do protocolo Ovsynch. Apesar deste programa ter demonstrado uma melhoria da taxa de gestação, tem o inconveniente da sua duração, pois o período de tempo entre o início do tratamento e a IA é cerca de 36 dias (Öztürk, Cirit, Baran & Ak, 2010).

O protocolo Doublesynch foi desenvolvido por Cirit, Ak & Ileri (2007), e constitui uma das mais recentes modificações do protocolo Ovsynch. Envolve uma administração adicional de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , dois dias antes de se iniciar o protocolo Ovsynch, com inseminação artificial em tempo fixo entre as 16-20 h após a última administração de GnRH (Öztürk, et al., 2010) (Figura 20).

Figura 20. Representação esquemática do protocolo Doublesynch. Original da autora.



Este protocolo resultou em ovulações sincronizadas tanto após a administração da primeira GnRH (88,9%), como da segunda (94,5%) (Cirit et al., 2007), tendo sido sugerido revelar o potencial para melhorar a fertilidade, tanto em vacas primíparas, como em vacas anéstricas (Öztürk et al., 2010).

No estudo realizado por Cirit et al. (2007), foi obtida uma taxa de gestação ligeiramente mais elevada em vacas primíparas tratadas com Doublesynch, em comparação as tratadas com o Ovsynch (72,2% versus 50,0%, respectivamente). Estes resultados foram confirmados pelo estudo realizado por Öztürk et al. (2010), em que o protocolo Doublesynch melhorou a taxa de gestação global por 43 unidades percentuais (29,8% versus 72,8%). No mesmo ensaio, foi também possível demonstrar que o protocolo Doublesynch melhorava a taxa de gestação, quer em vacas cíclicas, quer em anestro (72% versus 73,2%, respectivamente).

#### 4.4.RESSINCRONIZAÇÃO APÓS A 1ª IA PÓS-PARTO

Prever uma segunda inseminação é um processo complicado, uma vez que, no dia-a-dia, lidamos com animais que podem ou não estar gestantes. Deste modo, um diagnóstico de gestação preciso torna-se necessário (Lucy et al., 2004). Várias estratégias têm sido utilizadas para a ressinchronização do retorno ao estro em vacas previamente sincronizadas, com o objectivo de aumentar o número de vacas reinseminadas em tempo oportuno (Baruselli, sem data).

O processo tradicional tem sido por via da administração de uma dose luteolítica de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a todas as fêmeas que apresentem um CL palpável no momento do DG negativo. As vacas podem ser inseminadas com base na detecção do estro ou em tempo fixo, uma vez (às 80h) ou duas vezes (às 72 e 96h), após a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Uma vez que as inseminações resultam da detecção do cio, algumas vacas vazias podem ficar sem ser inseminadas durante semanas (Stevenson, 2001; Stevenson, 2005).

Recentemente, o CIDR foi utilizado como um meio de ressinchronização do estro. O dispositivo intravaginal é aplicado às vacas com DG desconhecido, durante 7 dias, a partir do dia 14, após a inseminação (Cheault, Boucher, Dame, Meyer & Wood-Folls, 2003; Stevenson, 2005). Cheault et al. (2003) revelaram que a utilização do dispositivo intravaginal melhorou a taxa global de detecção de cios em comparação com o grupo controlo não tratado e que a taxa de concepção para as vacas, após a remoção, do CIDR não foi diferente da do grupo controlo.

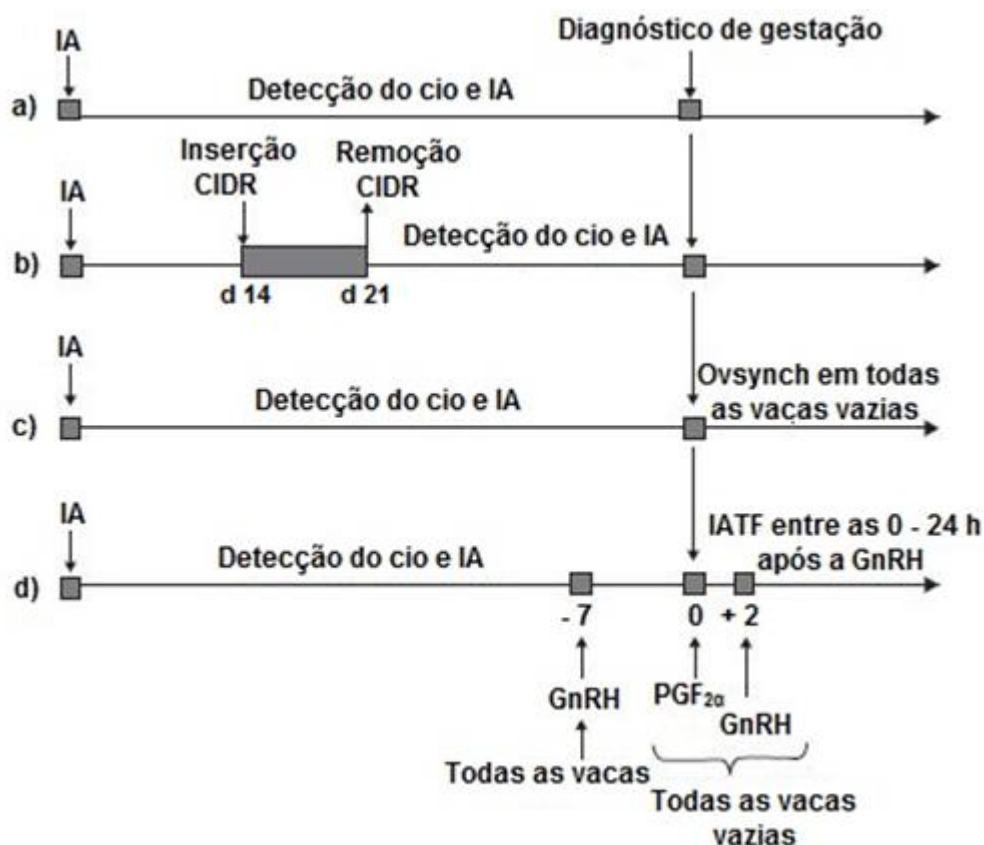
Uma alternativa é iniciar o protocolo Ovsynch no momento do DG em todos os animais não gestantes. Porém, um tratamento mais pró-activo, estabelece o início do protocolo Ovsynch antes do DG ter sido realizado, que por sua vez, ocorre numa fase precoce (28 dias após a inseminação) com recurso à ultrassonografia (Lucy et al. 2004). Uma vez que a GnRH não prejudica os animais gestantes, neste esquema de tratamento, todas as vacas ainda sem DG são tratadas com a primeira injeção de GnRH do protocolo Ovsynch 7 dias antes do DG, ou seja, aos 21 dias após a inseminação. Nas vacas que posteriormente são diagnosticadas como vazias (DG aos 28 dias), o protocolo Ovsynch é completado pela administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , seguida 48h depois pela segunda injeção de GnRH e IATF (0-24h). Usando esta estratégia, todas as vacas não gestantes serão reinseminadas 30 a 31 dias após a 1ª inseminação, relativamente aos restantes esquemas anteriormente mencionados (Whisnant et al., 1999; Lucy et al., 2004; Stevenson, 2005).

Quando o Ovsynch para ressinchronização é iniciado no dia 21 ou 28, após uma IA, as taxas de gestação são semelhantes à primeira IA, por ultrassonografia no dia 28 (33,1% versus 33,6%) e dia 42 (27,0% versus 26,8%). Além disso, a taxa de gestação para a segunda inseminação (ressinchronização) ao dia 31 ou 38, não variou entre os dois tratamentos (28,3% vs 31,4%). Portanto, parece ser seguro iniciar um protocolo Ovsynch para

ressincronização ao dia 21 após a IA, ainda antes do DG por ultrassonografia, que só se realiza ao dia 28 (Thatcher et al., 2006).

As estratégias utilizadas para a ressincronização após a primeira IA em bovinos estão apresentadas na Figura 21.

Figura 21. Representação esquemática das estratégias utilizadas para a ressincronização em bovinos. Adaptado de Stevenson (2005).



Legenda: (a) Todas as vacas após a inseminação são vigiadas para a exibição de cio e IA; (b) CIDR é aplicado durante 7 dias, a partir do dia 14 após a inseminação; (c) Protocolo Ovsynch é aplicado a todas as vacas com DG negativo; (d) Protocolo Ovsynch é iniciado em todas as vacas 7 dias antes do DG realizado aos 28 dias.

## **5. TRABALHO EXPERIMENTAL**

## 5.1.INTRODUÇÃO

O protocolo Ovsynch desenvolvido por Pursley et al. (1995), foi a primeira estratégia de IATF a ser utilizada na indústria de bovinos leiteiros e é, actualmente, uma das mais comuns. Com este tipo de protocolo consegue-se a inseminação das vacas num momento pré-determinando sem necessidade de detecção de cio, o que facilita o manejo da exploração (por exemplo, permite concentrar os partos numa altura mais favorável para o produtor). Apresenta ainda como vantagem adicional, a possibilidade de aumentar a taxa de submissão em explorações com baixa eficácia de detecção de cio, reduzindo-se, deste modo, os dias em aberto.

No entanto, diversos estudos demonstraram que há varias fases do ciclo éstrico em que o início do protocolo Ovsynch resulta em baixas taxas de gestação e, por outro lado, o sucesso também depende de as vacas estarem cíclicas ou em anestro. Com o intuito de ultrapassar estas limitações, têm sido propostas diversas modificações do protocolo original, sendo o protocolo Doublesynch uma das mais recentes (Cirit et al., 2007). Öztürk et al. (2010) demonstraram que com este protocolo podiam obter-se taxas de gestação com IATF satisfatórias, quer em vacas primíparas cíclicas, quer em vacas em anestro, independentemente da fase do ciclo éstrico em que o protocolo era iniciado. Uma vez que as vacas primíparas representam cerca de 30 a 50 % do efectivo, este programa teria vantagens claras, em comparação com o protocolo Ovsynch.

Apesar da finalidade destes esquemas de sincronização ser a inseminação de grupos de vacas de uma forma síncrona, a maioria dos produtores em Portugal usam este tipo de protocolos de forma individual, ou seja, aplicam-nos apenas em vacas que não são detectadas em cio ou não ficam gestantes após uma ou duas IA. Em consequência, o seu sucesso mantém-se geralmente muito aquém do esperado, uma vez que estes protocolos não foram desenhados com o objectivo de tratar a infertilidade ou eventuais doenças reprodutivas.

Neste trabalho procurou-se comparar o sucesso de dois protocolos de inseminação a tempo fixo (Ovsynch e Doublesynch) numa exploração de bovinos da raça Frísia Holstein, do concelho de Moita, através da análise comparativa da percentagem de animais com diagnóstico positivo entre os grupos controlo e grupos teste.

## **5.2.MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1.Caracterização da exploração**

O trabalho experimental foi realizado entre Janeiro e Junho de 2013, na exploração de bovinos leiteiros, Casa Agrícola Policarpo, situada na freguesia de Alhos Vedros, concelho da Moita, distrito de Setúbal.

A exploração tem uma área total de 9 hectares, dos quais 1,5 hectares são instalações pecuárias e a restante área é de cultivo de prados, para alimentação de vitelos de 6-12 meses. Possui um efectivo composto por um touro, 417 fêmeas, das quais 225 em lactação, 22 secas, 108 novilhas e 62 vitelas, maioritariamente da raça Frísia Holstein. As fêmeas estão distribuídas por parques consoante o seu nível produtivo e o seu escalão etário.

Esta exploração opera em regime intensivo, com os animais estabulados o ano inteiro e a sua principal actividade é a produção de leite. As vacas em produção são ordenhadas três vezes ao dia (primeira ordenha inicia-se às 6h, a segunda às 14h e a terceira às 21h), numa sala de duas linhas, cada uma com 10 pontos de ordenha, em paralelo. A média de produção de leite aos 305 dias é de 10.500 litros. Alimentação é feita de modo igual ao longo do ano, variando apenas em função do estado fisiológico do animal e do nível de produção de leite. A dieta é à base de silagem de milho, erva, palha e concentrado, sendo a sua distribuição feita duas vezes por dia, com recurso a um *unifeed*: a primeira toma após a ordenha da manhã e a segunda, após a ordenha da tarde. Os animais têm acesso *ad libitum* à água potável em tanques abertos distribuídos pelos parques.

Nesta exploração, os animais são vacinados para Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD), Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e Parainfluenza 3 (PI3) (Hiprabovis® 4, Laboratório Hipra, S.A, Espanha) de 6 em 6 meses e, anualmente para clostrídios [Bravoxin® 10, MSD Animal Health (Intervet Portugal – Saúde Animal, Lda), Portugal]. As desparasitações são realizadas pontualmente não se adoptando um esquema específico. O desparasitante utilizado é a ivermectina (Ivertin®, Laboratório Calier, Espanha).

### **5.2.2.Animais**

Neste trabalho experimental foram utilizadas vacas da raça Frísia Holstein, que para poderem participar neste estudo tiveram que obedecer a uma série de pré-requisitos, nomeadamente:

- Ter tido pelo menos um parto (vacas primíparas ou múltíparas);
- Ter um intervalo parto-inseminação entre 35 a 107 dias;
- Ser a primeira inseminação após o parto;
- Estar cíclica;
- Não ter tido parto distócico ou gemelar;

-Ter uma condição corporal  $\geq 2,5$  a  $< 4$ .

Para serem seleccionadas para o trabalho experimental, as vacas foram ainda sujeitas a um exame ginecológico para excluir os animais que apresentassem algum tipo de patologia reprodutiva ou não estivessem cíclicos. Durante este exame, a condição corporal (CC) foi avaliada e atribuída a cada animal usando a escala de 1 a 5, em que 1=magra e 5=obesa. Foram excluídos do estudo todos os animais com CC inferior 2,5 ou igual ou superior a 4.

Ao longo do trabalho experimental 13 animais foram eliminados do estudo:

- No grupo da PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , foram eliminadas quatro vacas que não foram detectadas em cio, 7 dias após a administração da PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e duas, por apresentarem corrimento purulento<sup>1</sup> no dia do cio;
- No grupo Ovsynch, foram eliminadas duas vacas que fizeram cio precoce (entre a administração da primeira GnRH e a PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), uma por apresentar-se em anestro<sup>2</sup> no dia da IA e, uma outra, por revelar corrimento purulento<sup>1</sup> no dia da IA;
- No grupo Doublesynch, foram eliminadas três vacas que apresentaram corrimento purulento<sup>1</sup> no dia da IA.

A população do estudo foi finalmente formada por 58 vacas, primíparas (n = 31) e múltiparas (n = 27).

### 5.2.3.Desenho experimental

O estudo foi realizado ao longo de 6 meses. As 58 vacas foram distribuídas aleatoriamente por um de quatro grupos, sendo que o grupo 1, designado como grupo cio espontâneo (G-CE), funcionou como grupo controlo, assim como o grupo 2, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (G-PG). Os grupos 3, Ovsynch (G-OVS), e grupo 4, Doublesynch (G-DOVS), funcionaram como os grupos em análise.

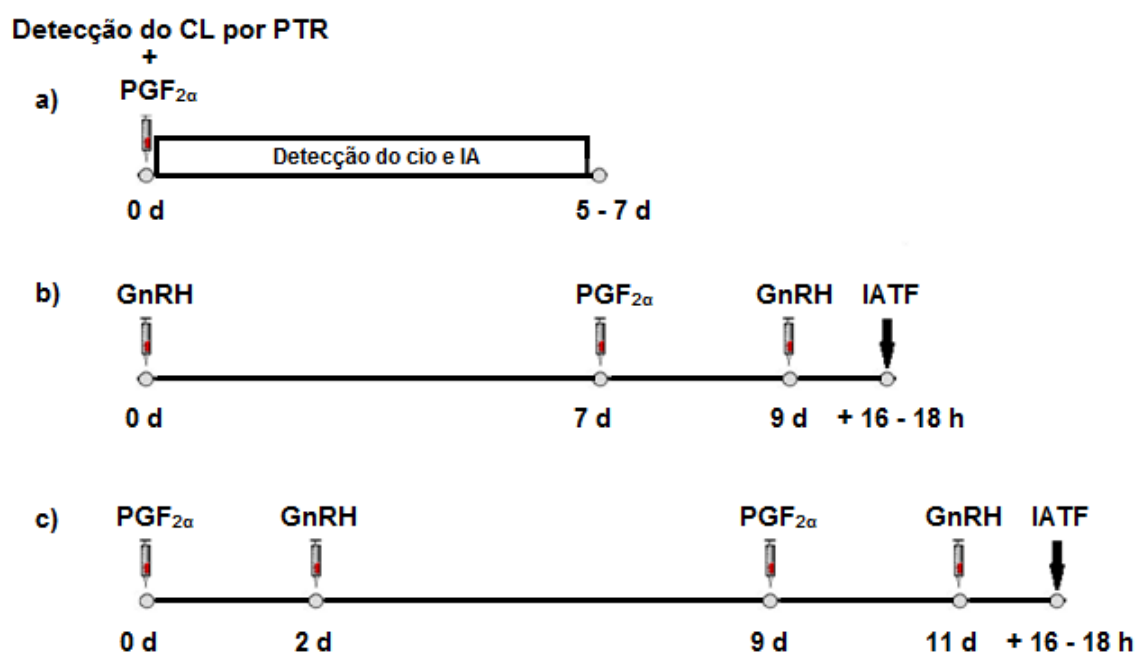
As vacas do G-CE (n=13) não receberam qualquer tipo de tratamento hormonal, tendo sido inseminadas após a detecção do cio, segundo a regra AM-PM. Às vacas pertencentes ao G-PG (n=15), após a palpação transrectal de um CL maduro, foi-lhes administrado 150  $\mu$ g por via intramuscular (im), em dose única, de um análogo da PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Dexcloprostenol, *GESTAVET-PROST*, Laboratório Hipra S.A., Espanha) no dia 0, seguido de detecção de cios nos 5 a 7 dias seguintes, e foram inseminadas após a detecção de cio, segundo a regra AM-PM. As vacas do G-OVS (n=15) foram sujeitas a um protocolo IATF, o Ovsynch, administrando-se 200  $\mu$ g, por via im, numa dose única de GnRH [Gonadorelina, *FERTAGYL*, *MSD Animal Health* (Intervet Portugal – Saúde Animal, Lda), Portugal] no dia 0; 150  $\mu$ g por via im, em dose única, de um análogo da PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Dexcloprostenol, *GESTAVET-PROST*, Laboratório Hipra S.A., Espanha) no dia 7; e nova administração de GnRH [Gonadorelina, *FERTAGYL*, *MSD Animal Health* (Intervet Portugal – Saúde Animal, Lda), Portugal] no dia 9.

---

<sup>1 e 2</sup> Uma vez que foram incluído animais duvidosos ao exame ginecológico, numa tentativa de aumentar o número de animais em cada grupo, posteriormente estes animais acabaram por ser eliminados do estudo (por apresentar corrimento purulento e estarem em anestro no dia da inseminação).

As vacas do grupo G-DOVS (n=15) foram também submetidas a um protocolo IATF, o Doublesynch, administrando 150 µg, por via im, numa dose única, de um análogo da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Dexcloprostenol, *GESTAVET-PROST*, Laboratório Hipra S.A., Espanha) no dia 0; 200 µg por via im, numa dose única, de GnRH [Gonadorelina, *FERTAGYL*, *MSD Animal Health* (Intervet Portugal – Saúde Animal, Lda), Portugal] no dia 2; uma nova administração do análogo da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Dexcloprostenol, *GESTAVET-PROST*, Laboratório Hipra S.A., Espanha) no dia 9; e no dia 11, a segunda administração de GnRH [Gonadorelina, *FERTAGYL*, *MSD Animal Health* (Intervet Portugal – Saúde Animal, Lda), Portugal]. Em ambos os grupos, G-OVS e G-DOVS, a IATF foi realizada entre as 16 a 18 h após a segunda administração de GnRH. Na Figura 22 estão representados de forma esquemática os tratamentos realizados aos três grupos: G-PG, G-OVS e G-DOVS.

Figura 22. Representação esquemática dos tratamentos realizados no trabalho experimental. Original da autora.



Legenda: a) G-PG; b) G-OVS; c) G-DOVS.

Os serviços de IA ou IATF ao longo do trabalho experimental foram realizados sempre pelo mesmo técnico (o gerente da exploração) de forma a minimizar variações de fertilidade induzida por múltiplos inseminadores. Foi utilizado sémen de vários touros de fertilidade comprovada, sendo que os emparelhamentos foram realizados pelo gerente da exploração como parte da gestão de rotina da exploração. Assim, foi assumido que qualquer efeito de serviço foi distribuído aleatoriamente entre os grupos em estudo.

Todos os tratamentos foram realizados à mesma hora do dia (17h-18h). Cada injeção do análogo da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e de GnRH foi efectuada por via intramuscular na zona dos músculos



glúteos, com recurso a uma seringa de 3ml (100 Sterican®, B.Braun Melsungen, Germany) e uma agulha estéril de 1,20 x 30 mm e 18G 1 ½” (100 Sterican®, B.Braun Melsungen, Germany), ambas descartáveis. Todos os procedimentos incluindo injeções, IA ou IATF, DG por ultrassonografia e palpação transrectal foram realizados com as fêmeas contidas em manga de observação.

#### **5.2.4.Detecção de cios**

Os animais do G-CE e G-PG foram observados diariamente por dois períodos do dia, de 30 minutos cada (um depois da ordenha da manhã e outro, depois da ordenha da tarde), para o registo do reflexo de imobilização, bem como de sinais secundários de manifestação de cio, e os observados em cio, foram inseminados segundo a regra AM-PM.

#### **5.2.5.Diagnóstico de Gestação**

Nos grupos G-PG, G-OVS e G-DOVS, o DG foi efectuado aos 30 dias após a inseminação, por ultrassonografia transrectal (Ecógrafo – Ultrascan 900, AML, Canadá), com sonda linear de 5 MegaHertz (MHz). A visualização de um corno uterino com líquido e presença de um embrião foram usados como indicadores positivos de gestação. Os animais com DG positivo por ultrassonografia foram reexaminados por palpação transrectal do conteúdo uterino aos 50 dias após a inseminação, para confirmar a gestação e registar eventuais mortes embrio-fetais.

Nas vacas do G-CE, o DG foi realizado apenas aos 50 dias, após a IA, por palpação transrectal.

Os DG por ultrassonografia foram realizados por um mestrando de medicina veterinária, enquanto que os DG por palpação transrectal foram realizados pelo Médico Veterinário responsável pelo controlo reprodutivo da exploração.

#### **5.2.6.Registo de dados e análise estatística**

Durante a realização deste trabalho experimental, todos os dados e registos recolhidos na exploração foram introduzidos numa base de dados criada no programa informático Microsoft Office Excel 2010, que serviu como suporte para a construção de gráficos e tabelas e, ainda para o cálculo estatístico. Esta base de dados, para além da identificação (número de casa) e idade de cada fêmea, incluiu também o número de partos, intervalo Parto - 1ª IA, datas das IA (1ª e 2ª), touros utilizados na 1ª IA, datas e os resultados dos DG subsequentes e, a produção de leite do contraste no mês da 1ª IA (ver Anexos).

Ao nível da estatística descritiva foram calculados: média, desvio padrão, máximo e mínimo para as seguintes variáveis: “idade”, “número de partos”, “intervalo Parto-1ª IA” e “produção de leite do contraste no mês da 1ª IA”.

Uma vez aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk verificou-se que, todas as variáveis não apresentavam uma distribuição normal. Posto isto, os testes utilizados na avaliação da associação entre as variáveis foram não paramétricos.

Foi realizado o teste Kruskal-Wallis para verificar se a distribuição das variáveis “idade”, “número de partos”, “intervalo Parto-1ª IA” e “produção de leite do contraste no mês da 1ª IA” era a mesma para os diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS, G-DOVS). Por fim, foram analisadas e trabalhadas as associações entre as variáveis “Grupo” x “Diagnóstico de gestação (1ª e 2ª IA)” para o total dos animais, assim como para os sub-grupos “Primíparas” e “Multíparas” pelo teste exacto de Fisher bilateral.

Estes testes foram executados com o programa IBM SPSS Statistics 19 para Windows.

### 5.3.RESULTADOS

Neste trabalho foi comparada a performance reprodutiva de um grupo de animais submetido a um protocolo Ovsynch modificado (Doublesynch) (n=15) com a registada para um outro grupo sujeito ao protocolo Ovsynch tradicional (n=15) e, para um grupo controlo negativo (cio espontâneo) (n=13) e grupo controlo positivo (PGF<sub>2α</sub>) (n=15). Na Tabela 5 apresenta-se a caracterização geral dos grupos de animais submetidos a um protocolo de IATF (Ovsynch e Doublesynch) e os controlos (negativo e positivo) relativamente às variáveis: “idade”, “número de partos”, “intervalo Parto-1ª IA” e “produção de leite do contraste no mês da 1ª IA”.

Tabela 5. Caracterização geral dos grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS).

	Grupo			
	G-CE	G-PG	G-OVS	G-DOVS
<b>Idade</b>	<sup>1</sup> 3,8 ± 1,5 (7 - 2)	3,6 ± 1,3 (6 - 2)	3,4 ± 0,9 (5 - 2)	4,3 ± 1,2 (6 - 2)
<b>Nº de partos</b>	1,9 ± 1,1 (4 - 1)	1,8 ± 1,1 (4 - 1)	1,5 ± 0,8 (3 - 1)	2,1 ± 0,9 (4 - 1)
<b>Intervalo Parto- 1ª IA</b>	51 ± 19,2 (107 - 35)	63,5 ± 18,5 (93 - 43)	62,4 ± 11,7 (83 - 44)	67,3 ± 13,7 (92 - 48)
<b>Produção de leite do contraste no mês da 1ª IA (L)</b>	39,2 ± 8,9 (64 - 29)	34,4 ± 7,1 (46 - 26)	34,1 ± 6,7 (46 - 25)	34,8 ± 5,8 (44 - 21)

Legenda: <sup>1</sup> Média ± Desvio Padrão  
(Máximo – Mínimo)

Através da análise descritiva dos dados trabalhados verificou-se que, em média, o G-OVS foi o que apresentou as fêmeas mais jovens e, que o G-DOVS foi o grupo mais velho, sendo as idades compreendidas entre 7 anos e 2 anos, para o total dos animais presentes no estudo. O mesmo se verificou com o número médio de partos, tendo sido registados valores médios de 1,5 partos para os animais do G-OVS e, de 2,1 partos para os animais do G-DOVS. No entanto, constatou-se que, em média, o número de dias entre o parto e a 1ª IA foi menor no G-CE (51 dias), relativamente aos restantes grupos, tendo sido mais elevado no grupo G-DOVS (67,3 dias). Quanto à produção de leite do contraste no mês da 1ª IA, o G-CE apresentou em média uma produção de leite superior (39,2 litros), relativamente aos restantes grupos, que registaram, em média, uma produção de cerca de 34 litros.

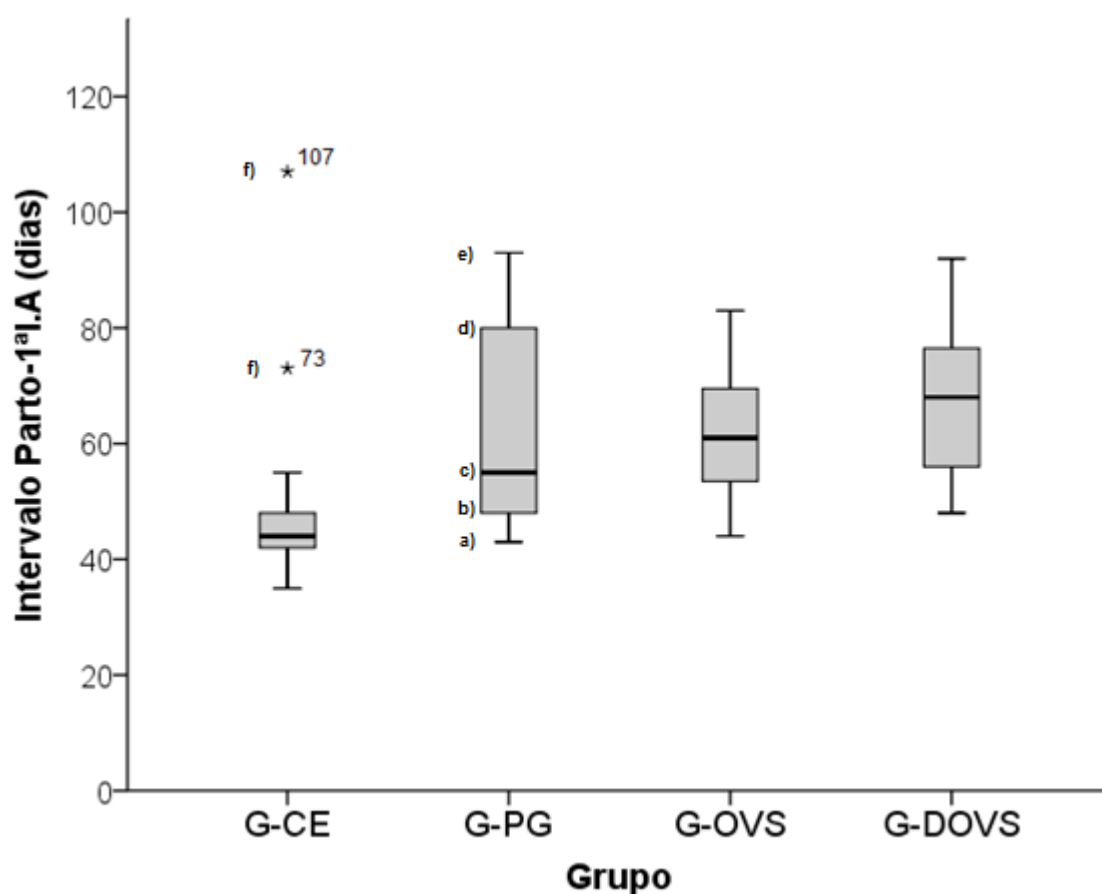
Quanto ao desvio padrão, obtiveram-se valores mais baixos para os animais dos grupos submetidos a um protocolo de IATF (Ovsynch e Doublesynch), relativamente aos animais dos grupos controlo (negativo e positivo). Isto significa que os resultados registados pelos animais do G-OVS e G-DOVS foram mais consistentes, relativamente aos animais dos G-CE e G-PG, onde houve uma maior variação.

Quando se procedeu à análise estatística, com o teste Kruskal-Wallis, para verificação se a distribuição das variáveis era a mesma para os diferentes grupos, constatou-se que os dados não evidenciaram diferenças significativas para as variáveis: “idade” ( $p=0,173$ ), “número de partos” ( $p=0,209$ ) e “produção de leite do contraste no mês da 1ª IA” ( $p=0,309$ ). Porém, o teste evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para a variável “intervalo Parto-1ª IA” ( $p=0,005$ ).

Uma vez, que se registaram diferenças significativas ( $p=0,005$ ) na distribuição da variável “intervalo entre Parto-1ª IA” entre os diferentes grupos, realizou-se uma análise dos grupos por pares (G-CE/G-PG, G-CE/G-OVS, G-CE/G-DOVS, G-PG/G-OVS, G-PG/G-DOVS e G-OVS/G-DOVS). Constatou-se então que a distribuição daquela variável no G-CE revelou diferenças estatisticamente significativas para o grupo G-PG ( $p=0,011$ ), bem como para o G-OVS ( $p=0,004$ ) e G-DOVS ( $p=0,002$ ). No entanto, os dados não evidenciaram a existência de qualquer diferença entre a distribuição da variável “intervalo entre Parto-1ª IA” entre os G-PG/G-OVS ( $p=0,740$ ), G-PG/G-DOVS ( $p=0,361$ ) e os G-OVS/G-DOVS ( $p=0,383$ ).

O Gráfico 1 ilustra a distribuição dos valores do intervalo entre Parto-1ª IA entre os diferentes grupos.

Gráfico 1. Distribuição da variável “Intervalo Parto-1ª IA” entre os diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS).



Legenda: a) extremo inferior corresponde ao valor mínimo; b) limite inferior da caixa corresponde ao 1º quartil; c) linha que divide a caixa corresponde à mediana; d) limite superior da caixa corresponde ao 3º quartil; e) extremo superior corresponde ao valor máximo e f) corresponde a “outliers” ou valores atípicos.

O G-PG apresenta uma maior variação do intervalo entre Parto-1ª IA. No entanto, o seu valor médio é inferior aos grupos G-OVS e G-DOVS. Do mesmo modo, o G-DOVS apresenta um valor médio superior em relação aos restantes grupos (G-CE, G-PG e G-OVS). Dos quatro grupos, o G-CE é o que apresenta uma menor variação do intervalo entre Parto-1ª IA e, é o que possui o menor valor médio. Por outro lado, foi possível observar dois “outliers” de valor superior relativamente aos restantes elementos do grupo.

Na Tabela 6 apresentam-se os dados relativos aos resultados dos diagnósticos de gestação à 1ª IA, realizados nos animais dos grupos controlos (G-CE e G-PG) e dos grupos das vacas submetidas a um protocolo de IATF (G-OVS e G-DOVS). Para o diagnóstico de gestação foram contabilizadas as informações obtidas por ultrassonografia (aos 30 dias) e palpação transrectal (aos 50 dias), realizadas no âmbito do trabalho experimental e, ambas intervenções foram coincidentes quanto aos resultados de DG registados.

Tabela 6. Relação do diagnóstico de gestação à 1ª IA nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS).

		Grupo				Total
		G-CE	G-PG	G-OVS	G-DOVS	
<b>DG +</b>		30,8% (4/13)	40,0% (6/15)	13,3% (2/15)	20,0% (3/15)	25,9% (15/58)
<b>DG -</b>		69,2% (9/13)	60,0% (9/15)	86,7% (13/15)	80,0% (12/15)	74,1% (43/58)

A percentagem de animais com DG positivo foi inferior em todos os grupos (25,9%) relativamente aos animais com DG negativos (74,1%). Nos G-CE e G-PG verificou-se uma percentagem superior de animais com DG positivo (30,8% e 40,0%, respectivamente) comparativamente com o G-OVS (13,3%) e G-DOVS (20,0%). Porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,377$ ), pelo teste exacto de Fisher bilateral.

Na tabela 7, são apresentados os resultados do DG à 1ª IA em vacas múltiparas e primíparas para os diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS).

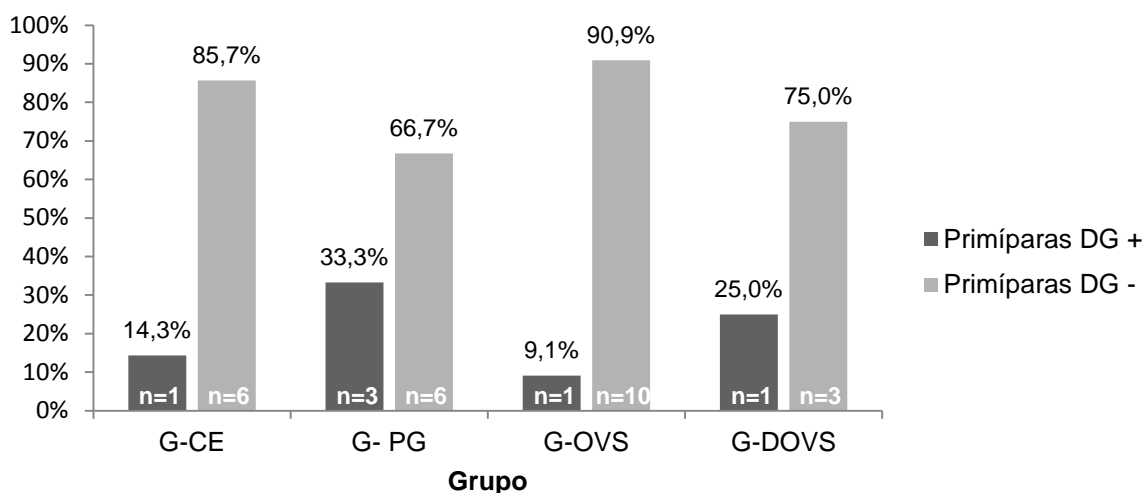
Tabela 7. Relação do diagnóstico de gestação à 1ª IA em vacas primíparas e múltiparas nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS).

		Grupo				Total
		G-CE	G-PG	G-OVS	G-DOVS	
<b>Múltiparas</b>	<b>DG +</b>	50,0% (3/6)	50,0% (3/6)	25,0% (1/4)	18,2% (2/11)	33,3% (9/27)
	<b>DG -</b>	50,0% (3/6)	50% (3/6)	75,0% (3/4)	81,8% (9/11)	66,7% (18/27)
<b>Primíparas</b>	<b>DG +</b>	14,3% (1/7)	33,3% (3/9)	9,1% (1/11)	25,0% (1/4)	19,4% (6/31)
	<b>DG -</b>	85,7% (6/7)	66,7% (6/9)	90,9% (10/11)	75,0% (3/4)	80,6% (25/31)

Pode constatar-se, no geral, que o grupo de vacas múltiparas registou maior percentagem de animais com DG positivo à 1ª IA, relativamente ao grupo de vacas primíparas (33,3% vs 19,4%, respectivamente), embora esta diferença não tenha revelado significância estatística ( $p=0,377$ ).

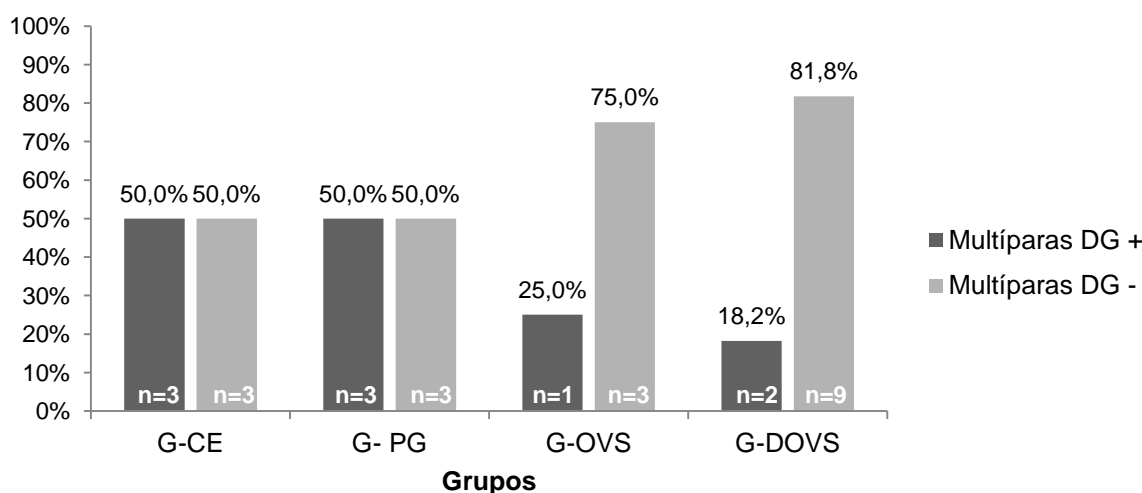
Para uma melhor análise, os Gráficos 2 e 3 representam a percentagem de animais com DG à 1ª IA, positivo ou negativo, em vacas primíparas e múltiparas, respectivamente.

Gráfico 2. Representação gráfica da percentagem de vacas primíparas com diagnóstico de gestação à 1ª IA nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS).



Relativamente às vacas primíparas, o DG positivo à 1ª IA foi inferior em todos os grupos (19,4%), relativamente ao DG negativos (80,6%). Os grupos, G-PG e G-DOVS, foram os que tiveram melhores percentagens de animais com DG positivo à 1ª IA (33,3% e 25,0%, respectivamente), relativamente ao G-CE (14,3%) e ao G-OVS (9,1%). Todavia, estas diferenças não foram significativas ( $p=0,567$ ).

Gráfico 3. Representação gráfica da percentagem de vacas múltiparas com diagnóstico de gestação à 1ª IA nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS).



Quanto às vacas múltiparas, os grupos G-CE e G-PG, tiveram o mesmo número de animais com DG positivo (50,0%) à 1ª IA. Porém, o G-OVS registou melhor percentagem de animais com DG positivo à 1ª IA relativamente ao G-DOVS (25,0% vs 18,20%, respectivamente). Mas, esta diferença, mais uma vez, não foi estatisticamente significativa ( $p=0,411$ ).

Por fim, na Tabela 8, apresentam-se as percentagens de vacas com DG positivo e negativo à 2ª IA, nos diferentes grupos. Todas as fêmeas sujeitas à 2ª IA foram inseminadas após a observação do cio, segundo a regra AM-PM, sem terem sido submetidas a qualquer tipo de tratamento hormonal.

Tabela 8. Relação do diagnóstico de gestação à 2ª IA nos diferentes grupos (G-CE, G-PG, G-OVS e G-DOVS).

	Grupo				Total
	G-CE	G-PG	G-OVS	G-DOVS	
<b>DG +</b>	50,0% (4/8)	55,6% (5/9)	50,0% (6/12)	41,7% (5/12)	48,8% (20/41)
<b>DG -</b>	50,0% (4/8)	44,4% (4/9)	50,0% (6/12)	58,3% (7/12)	51,2% (21/41)

A percentagem de animais com DG positivo à 2ª IA foi ligeiramente inferior nos diferentes grupos, relativamente à percentagem de animais com DG negativo (48,8% vs 51,2%, respectivamente). Todavia, estes resultados foram superiores, para todos os grupos, aos obtidos após a 1ª IA (ver Tabela 6). Os grupos, G-CE e G-OVS, apresentaram a mesma percentagem de animais com DG positivo à 2ª IA (50,0%). O G-PG registou uma percentagem ligeiramente superior de animais com DG positivo à 2ª IA em comparação com o G-DOVS (55,6% vs 41,7%, respectivamente). No entanto, o G-DOVS, foi o único grupo que apresentou uma maior percentagem de animais com DG negativo (58,3%) à 2ª IA relativamente aos animais com DG positivo (41,7%).

Após a análise destes dados pelo teste exacto de Fisher bilateral, constatou-se não haver diferenças significativas ( $p=0,972$ ), entre os grupos em estudo.

## 5.4.DISCUSSÃO

No presente trabalho experimental, a percentagem de animais com diagnóstico de gestação positivo foi superior nos grupos controlos [G-CE (30,8%) e G-PG (40,0%)], relativamente aos grupos submetidos a um protocolo de IATF [G-OVS e G-DOVS (13,3% e 20,0%, respectivamente)], mas essas diferenças não foram significativas ( $p=0,377$ ). Estes resultados não foram totalmente concordantes com os obtidos por Pursley et al. (1997b), que trabalhando com um lote maior de vacas leiteiras não encontraram diferenças entre as taxas de gestação do seu grupo controlo (38,8%) e o grupo Ovsynch (37,8%). Pursley et al. (1998) referiram que a taxa de gestação após Ovsynch era semelhante (Pursley et al., 1997a; Pursley et al., 1997b) ou apenas ligeiramente inferior (Burke et al., 1996; Stevenson et al., 1996), comparativamente quando a IA era realizada após observação do cio, em vacas leiteiras em produção. Todavia, em diversos estudos quando o estro foi sincronizado e a inseminação foi programada após a observação do cio, a fertilidade foi superior do que quando foi realizada a tempo fixo após sincronização (Larson e Ball, 1982; Dailey et al., 1983; Lucy et al, 1986, citados por El-Zarkouny et al., 2004). Uma quebra da fertilidade após IATF é, frequentemente, atribuída a uma sincronização deficiente do cio e da ovulação, de modo a permitir a eleição do momento adequado de IA em relação à ovulação (Forgwell et al., 1986, citados por El-Zarkouny et al., 2004). Wiltbank et al. (2006) também confirmaram esse facto. Segundo Driancourt (2000), esta redução da fertilidade após a IATF podia ser consequência, quer de um intervalo inadequado entre IA e a ovulação, quer da ovulação de um oócito envelhecido, num ambiente tubárico sub-ótimo.

Estas diferenças nas taxas de gestação do protocolo Ovsynch entre os vários estudos poderão dever-se a uma possível perda da eficácia do mesmo, por estar dependente da fase do ciclo éstrico em que é iniciado (Keith, Leslie, Johnson & Walton, 2005). A fertilidade com o protocolo Ovsynch é elevada quando as vacas ovulam com a primeira administração de GnRH. O folículo pré-ovulatório que vai estar presente no momento da administração da segunda injeção de GnRH irá desenvolver-se durante um reduzido período de dominância (Vasconcelos et al., 1999; Keith et al., 2005), eliminando assim o risco da presença de um FD persistente naquela altura, assegurando também a presença de um CL sensível, no momento da administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Herlihy, Crowe, Diskin & Buther, 2012). Tudo isto resulta numa melhoria da sincronização da ovulação e uma taxa de gestação elevada (Keith et al., 2005).

No entanto, o protocolo Ovsynch é aplicado em todas as vacas elegíveis, sem se ter em conta a fase do ciclo éstrico, o que resulta na ovulação de um folículo dominante em 50 a 70% das vacas leiteiras (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999), com o surgimento de uma nova onda folicular em média 2,5 dias depois (variação de 2-4 dias) (Pursley et al., 1995). Quando o protocolo é iniciado numa fase muito precoce (dias 1 a 4 do ciclo éstrico),



normalmente não há nenhum folículo com capacidade de ovulação, em resposta à primeira GnRH. Consequentemente, o FD que vai ovular após a administração da segunda GnRH libertará um oócito envelhecido, de fertilidade comprometida. Por outro lado, quando o Ovsynch tem início numa fase tardia do ciclo éstrico (13-17 dias do ciclo éstrico), a percentagem de fêmeas que ovulam espontaneamente é bastante elevada, conduzindo a uma taxa de sincronização menor, uma vez que a luteólise fisiológica ocorre antes da administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , determinando assim, uma menor percentagem de fêmeas que ovulam no momento mais adequado após IATF (Vasconcelos et al., 1999; Moreira et al., 2001; Gümen et al., 2012) ou ainda, quando o Ovsynch tem início durante o pró-estro (isto é, 18 a 21 dias do ciclo éstrico) pode ocorrer uma falha da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  em promover a regressão do CL e resultar em taxa de gestação mais baixa após a IATF (Moreira et al., 2001).

O protocolo Ovsynch permite resultados satisfatórios apenas em vacas cíclicas, pelo que não deve ser usado em vacas em anestro ou em novilhas (Pursley et al., 1995; Stevenson, Smith & Hawkins, 2000; Chastant-Maillard, 2006). O sucesso geral do protocolo depende muito do número deste tipo de fêmeas quando o mesmo é aplicado aleatoriamente numa exploração (Lucy et al., 2004). A taxa de concepção obtida com vacas em anestro submetidas a estes protocolos oscila entre 9% e 37% (Gümen, Guenther & Wiltbank, 2003), enquanto que, com vacas cíclicas a taxa de gestação do protocolo Ovsynch ronda os 21 a 42% (Gümen et al., 2003) ou 22-53% (Chastant-Maillard, 2006). Por estas razões, no presente ensaio, foi realizada a palpação transrectal de forma a avaliar-se da presença de um corpo lúteo antes de se iniciar o tratamento em ambos os protocolos.

Num estudo realizado por Santos et al. (2003) apenas uma pequena percentagem de vacas evidenciaram sinais de cio (8 a 16% das vacas) quando tratadas com o protocolo Ovsynch. No presente estudo não foi relatado pelo gerente da exploração a evidência de sinais de cio nas vacas que foram submetidas ao protocolo Ovsynch, embora se tenha optado desde logo pela inseminação a tempo fixo. A ausência de comportamento de cio neste protocolo poderá dever-se ao facto de o pico de estrogénios induzido pelo folículo pré-ovulatório ser prematuramente bloqueado pelo pico de LH induzido pela segunda administração de GnRH. No que se refere ao protocolo Ovsynch modificado (Doublesynch) comparativamente com o protocolo Ovsynch, o G-DOVS apresentou uma percentagem de animais com diagnóstico de gestação positivo ligeiramente superior (20% vs 13,3 %), como se pode concluir da análise da Tabela 7. Esta diferença poderá dever-se ao facto da administração da primeira  $\text{PGF}_{2\alpha}$  do protocolo Doublesynch promover a lise do CL presente no início do tratamento, evitando-se desta forma a regressão espontânea do CL das fêmeas que estivessem numa fase tardia do ciclo éstrico no momento da primeira GnRH, obtendo-se deste modo, uma melhor taxa de sincronização. Cirit et al. (2007) verificaram que a regressão lútea e a ovulação ocorriam mais próximo do momento da administração da segunda GnRH, quando se administrava uma dose  $\text{PGF}_{2\alpha}$  seguida de uma dose de GnRH, 48h depois, nas vacas

que se encontravam em diestro no início do tratamento, evitando-se assim, a luteólise espontânea nestas fêmeas.

Bisinotto, Chebel e Santos (2010) verificaram que a ovulação do FD da primeira onda de crescimento folicular de um ciclo éstrico resultava em fertilidade inferior à da segunda onda folicular, sugerindo que este decréscimo de fertilidade poderia dever-se ao facto de o FD da primeira onda folicular crescer sob o efeito de menores concentrações de progesterona do que o FD da segunda onda, concluindo assim que os FD que crescem sobre o efeito de elevadas concentrações de progesterona apresentam uma fertilidade superior. Erb et al. (1976), citados por El-Zarkouny et al. (2004), relataram que as concentrações plasmáticas de progesterona, 34-48h antes da onda pré-ovulatória de LH, foram mais elevadas em vacas que concebiam, em comparação com aquelas que o não fizeram. Folman et al. (1990) e Wiltbank (2006) afirmaram que concentrações elevadas de progesterona no momento da administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ou antes da IA, correlacionaram-se positivamente com a taxa de gestação. Uma vez que durante o protocolo Doublesynch é administrada uma  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , dois dias antes de se iniciar o Ovsynch, a condição anterior não se verifica. Porém, está descrito que quando a primeira GnRH do Ovsynch origina uma ovulação, a probabilidade de gestação é mais elevada (Öztürk et al., 2010). No estudo realizado por Cirit et al. (2007), a pré-sincronização (administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , dois dias antes de se iniciar o protocolo Ovsynch), resultou em ovulações sincronizadas tanto após a administração da primeira GnRH (88,9%) como após a segunda GnRH (94,5%). Além disso Randel et al. (1996) e Cruz et al. (1997), citados por Öztürk et al. (2010), sugeriram que a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  potenciava os efeitos da administração de GnRH para originar pulsos de LH e provocar ovulação. O estudo realizado por Öztürk et al. (2010) confirmou esta ideia, ao verificar que a sinergia entre a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e a GnRH é mais eficaz do que a GnRH isoladamente, relativamente à possibilidade de se iniciar uma nova onda folicular e/ou produzir um FD com uma melhor competência para a fertilização, no final do tratamento.

Todavia, a diferença na percentagem de animais com diagnóstico positivo entre o G-DOVS e G-OVS, no presente estudo, não foi de encontro às expectativas da autora, uma vez que no estudo realizado por Öztürk et al. (2010), os autores obtiveram uma diferença de 43 unidades percentuais [DOVS (72,8%) vs OVS (29,8%)]. A autora sugere, como explicação, que esta situação poderá ter resultado do facto de os grupos de vacas utilizados naquele estudo, terem sido constituídos apenas por primíparas e fêmeas em anestro e, no presente estudo, tal selecção não foi possível, uma vez que o gerente da exploração não se mostrou disponível para utilizar vacas em anestro em protocolos de sincronização de ovulação, visto que as possibilidades de retorno financeiro nesses animais serem mais reduzidas e, também, dada a reduzida dimensão da exploração não foi possível a utilização exclusiva de vacas primíparas. Mas quando se compararam os grupos G-OVS e G-DOVS, dentro do subgrupo de fêmeas primíparas, o G-DOVS revelou 25,0% de vacas com diagnóstico de

gestação positivo, enquanto o G-OVS teve apenas 9,1%. Verificamos pois, que os nossos resultados parecem ir de encontro aos resultados obtidos por Cirit et al. (2007) e Öztürk et al. (2010), que afirmaram que o protocolo Doublesynch era, potencialmente, um novo método de sincronização de ovulação para vacas Frísias Holstein primíparas e/ou em anestro. Por oposição, ao analisarmos o subgrupo de vacas múltíparas, verificamos que o G-DOVS (18,2%) não apresentou qualquer vantagem relativamente ao G-OVS (25,0%). Randel et al. (1996), Cruz et al. (1997) e López-Gatius et al. (2004), citados por Öztürk et al. (2010), demonstraram que o efeito favorável da administração adicional PGF<sub>2α</sub> sobre a ovulação é mais acentuado em animais com problemas de ovulação, como as vacas anéstricas ou primíparas, o que explicaria parcialmente o porquê do protocolo Doublesynch não apresentar benefícios quando comparado com o protocolo Ovsynch, relativamente às vacas múltíparas. No entanto, há que salientar que esta comparação entre G-OVS e G-DOVS tem de ser interpretada com cuidado, uma vez que a distribuição do número de partos entre estes dois grupos não está balanceada. Isto faz com que os resultados obtidos possam estar influenciados pelo parâmetro de avaliação binomial primípara/múltipara.

Ao analisar a Tabela 8, verificou-se que, de uma forma geral, o subgrupo das vacas múltíparas apresentou uma percentagem de animais com diagnóstico positivo superior à do que o subgrupo de vacas primíparas (33,3% vs 19,4%, respectivamente). Resultados semelhantes foram obtidos por Pursley et al. (1997a) e Pursley et al. (1998), que ao estudarem a paridade verificaram que a taxa de gestação foi superior para as vacas múltíparas, relativamente às vacas primíparas. Isto deve-se ao facto de as vacas primíparas apresentarem um atraso no início da actividade cíclica e uma maior frequência de anestro (35,6%), comparativamente às vacas múltíparas (16,9%) (Öztürk et al., 2010). Esta situação está geralmente associada a um maior período de balanço energético negativo por parte daquelas fêmeas, uma vez que as vacas de 1ª lactação não só necessitam de assegurar a produção de leite como o seu próprio crescimento (Tanaka et al., 2008; Sá Filho, Crespilho, Santos, Perry & Baruselli, 2010).

Relativamente aos grupos de ovulações espontâneas, o G-PG revelou uma maior percentagem de animais com diagnóstico positivo, quando comparado com o G-CE (40,0% vs 30,8%, respectivamente). A autora propõe duas possíveis hipóteses para justificar essa diferença, ainda que não significativa. A primeira, poderá ser devido ao facto de as vacas do G-PG terem sido inseminadas num momento mais adequado relativamente à ovulação, uma vez que a administração da PGF<sub>2α</sub> permite concentrar os cios (durante cerca de 5 a 7 dias) e o produtor pode ficar mais atento aos sinais dessas fêmeas, situação que já não ocorreu no G-CE, uma vez que estas podiam apresentar cio em qualquer altura do mês, podendo muitas vezes, terem sido inseminadas apenas com base em sinais secundários de cio. A segunda hipótese poderá dever-se ao facto de o G-CE ter sido constituído por um grupo de fêmeas com um intervalo entre o Parto-1ª inseminação inferior ao do G-PG, e assim, essas

vacas poderiam não apresentar então, uma completa involução uterina, no momento da inseminação artificial. Jackson et al. (1979) e Mcmillan e Day (1982), citados por Lane et al. (2008) relataram que o tratamento de vacas em diestro com uma única dose de PGF<sub>2α</sub> melhorou significativamente a taxa de concepção à 1ª IA, relativamente ao grupo controlo não tratado. Stevenson e Pursley (1994), citados por Pursley et al. (1995), referiram que a taxa de detecção deaios melhorou e que a gestão da IA foi mais eficiente nos animais sincronizados com PGF<sub>2α</sub>, em comparação com os animais não tratados.

Para averiguar se as vacas previamente beneficiadas, retornaram ou não ao cio, o gerente da exploração realiza um programa para despiste do retorno ao cio (e por conseguinte, de não gestação) entre os dias 18-25 após IA. No entanto, sabe-se que cerca de 5% das vacas gestantes demonstram sinais de cio durante a gestação (Wiltbank, 2006). Na exploração onde foi realizado o trabalho experimental, o gerente tem como norma inseminar as vacas quando estas retornam ao cio dentro da altura esperada, sem que o médico veterinário tenha avaliado o estado dessas fêmeas. A autora pensa não ser este o procedimento ideal, uma vez que a vaca poderá estar gestante e a inseminação cervical profunda destes animais poder resultar em morte embrionária. Deste modo, nos grupos controlos (G-CE e G-PG) e nos grupos submetidos a protocolos de IATF (G-OVS e G-DOVS), os retornos ao cio das vacas desses grupos foram considerados como diagnósticos de gestação negativos.

É conhecido o antagonismo entre a produção de leite e a fertilidade das vacas (Lucy, 2001). Neste estudo tentou avaliar-se a influência da produção de leite nos diferentes grupos, mas não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,309$ ). Assim, a autora sugere que tal pode dever-se ao facto de, uma só medição da produção de leite, no dia do contraste, pode não ter sido suficiente para caracterizar a produção de cada vaca. Tenhagen, Vogel, Drillich, Thiele e Heuwieser (2003) verificaram que as vacas inseminadas mais tarde, na lactação, apresentavam melhores taxas de concepção à 1ª IA do que as vacas inseminadas mais precocemente, sugerindo que este facto poderia dever-se à diminuição da influência do balanço energético negativo com o aumento do intervalo pós-parto, concluindo assim que a fase da lactação tinha um impacto significativo sobre a taxa de concepção à 1ª IA.

O objectivo de avaliar a percentagem de vacas com diagnóstico positivo à segunda IA (ver Tabela 9) foi o de tentar perceber se os tratamentos hormonais aplicados nos diferentes grupos tiveram algum efeito na fertilidade subsequente à primeira IA, nas fêmeas não gestantes. Uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,972$ ), a autora sugere assim que a melhoria da percentagem de animais com diagnóstico de gestação positivo à segunda IA, relativamente aos animais da primeira IA, poderá dever-se ao facto de estes animais terem sido sujeitos a uma segunda IA numa fase mais tardia do pós-parto. A duração do período voluntário de espera é, em parte, uma decisão de gestão da exploração. Este período varia de 40 a 70 dias na maioria das

explorações. Uma parte da duração deste período baseia-se na necessidade fisiológica para o aparelho reprodutor da vaca submeter-se a um “processo de cura” – a involução uterina. Este processo fisiológico inclui alterações macro e microscópicas que preparam o aparelho reprodutor, especialmente o útero, para uma nova gestação. Alguns estudos indicam que períodos de repouso mais longos melhoram as taxas de concepção, possivelmente devido à melhoria de diversas características uterinas (Stevenson, 2005). Pursley et al. (1997b) referiram que para se obter taxas de gestação máximas por IA, a primeira inseminação deveria ser realizada depois dos 75 dias do parto.

Uma vez que por falta de disponibilidade financeira, não foi possível a realização de doseamentos de progesterona e/ou um acompanhamento ecográfico da dinâmica das estruturas ovárias (FL e CL), a autora não pode concluir que a baixa percentagem de vacas com diagnóstico de gestação positivo, no presente estudo, tenha sido devida a uma falha na sincronização da ovulação, relativamente ao momento em que as fêmeas foram submetidas à IA ou então, a outros factores que não foram possíveis de serem controlados, uma vez que a rotina da exploração não permitiu.

A ausência de diferenças estatisticamente significativas, no presente trabalho experimental, muito possivelmente deveu-se ao reduzido número da amostra em cada grupo.

## **5.5.CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode concluir-se que o protocolo Ovsynch modificado (Doublesynch) não revelou a eficiência esperada, apesar de se ter verificado que houve uma resposta numericamente mais favorável na sincronização da ovulação em vacas primíparas, relativamente ao protocolo Ovsynch tradicional, a qual não se revelou estatisticamente significativa.

No entanto, os resultados do presente estudo deverão ser analisados com alguma reserva tendo em conta o tamanho da amostra trabalhada. No futuro, deverão ser realizados outros estudos com amostras maiores e com um desenho experimental mais completo, para avaliar a eventual diferença entre estes dois protocolos de IATF.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J. & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69, 72-80.
- Anónimo. (1987). IA manual de entrenamiento Curtiss Breeding Service, 48 pp.
- Antunes, G., Marques, A., Santos, P., Chaveiro, A. & Silva, F. M. (2008). *Atlas do ovócito e do embrião bovino: breves noções de morfologia e endocrinologia*. São João do Estoril (Lisboa): Princípia.
- Allcock, J. G & Peters, A. R. (2008). Controle farmacológico da reprodução. In A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd & R. G. Eddy (Eds). *Medicina bovina: doenças e criação de bovinos*. (2ª edição). (pp. 596-605). São Paulo: Roca.
- Althouse, G. (2007). Artificial insemination. In H. Schatten & G. M. Constantinescu, *Comparative reproduction biology*. (5<sup>th</sup> ed.). (pp. 159-169). USA: Blackwell Publishing.
- Austin, E. J., Mihm, M., Ryan, M. P., Williams, D. H. & Roche, J. F. (1999). Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *Journal of Animal Science*, 77, 2219-2226.
- Ax, R. L., Dally, M. R., Didion, B. A., Lenz, R. W., Love, C. C., Varner, D. D., Hafez, B. & Bellin, M. E. (2004). Inseminação artificial. In B. Hafez & E. S. E. Hafez (Eds), *Reprodução animal*. (7ª edição). (pp. 381-394). Brasil: Manole, Ltda.
- Ball, P. J. H. & Peters, A. R. (2004a). Anatomy. In P.J.H. Ball & A.R. Peters, *Reproduction in cattle*. (3th ed.). (pp. 13-27). Oxford: Blackwell Publishing.
- Ball, P. J. H. & Peters, A. R. (2004b). The ovarian cycle. In P.J.H. Ball & A.R. Peters, *Reproduction in cattle*. (3th ed.). (pp. 40-55). Oxford: Blackwell Publishing.
- Ball, P. J. H. & Peters, A. R. (2004c). The post-partum period. In P.J.H. Ball & A.R. Peters, *Reproduction in cattle*. (3th ed.). (pp. 79-91). Oxford: Blackwell Publishing.
- Ball, P. J. H. & Peters, A. R. (2004d). Artificial Insemination. In P.J.H. Ball & A.R. Peters, *Reproduction in cattle*. (3th ed.). (pp. 124-139). Oxford: Blackwell Publishing.
- Ball, P. J. H. & Peters, A. R. (2004e). Oestrous behavior and its detection. In P.J.H. Ball & A.R. Peters, *Reproduction in cattle*. (3th ed.). (pp. 92-109). Oxford: Blackwell Publishing.
- Ball, P. J. H. & Peters, A. R. (2004f). Artificial control of the oestrous cycles. In P.J.H. Ball & A.R. Peters, *Reproduction in cattle*. (3th ed.). (pp. 110-123). Oxford: Blackwell Publishing.
- Baruselli, P. (sem data). Reprodução de bovinos. In M. Ptaszynska (Ed), *Compêndio de reprodução animal*. Intervet International. (pp. 13-124).
- Binelli, M., Ibiapina, B. T. & Bisinotto, R. S. (2006). Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. *Acta Scientiae Veterinarie*, 34, 1-7.

- Bisinotto, R. S., Chebel, R. C. & Santos, J. E. P. (2010). Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 3578-3587.
- Britton, L. (sem data). *Alta Genetics Inc.- AI. School*. (Powerpoint). Alta Genetics: Canadá.
- Cavalieri, J., Hepworth, G., Fitzpatrick, L.A., Shephard, R.W. & Macmillan, K.L. (2006). Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, 65, 45-64.
- Cerón, J. H. (sem data). *Manejo reproductivo en bovinos en sistemas de producción de leche*. México: Faculdade de Medicina Veterinária y Zootecnia, Universidade Nacional Autónoma de México. (pp.100-130).
- Chagas e Silva, J. N. (1985). *I Parte- azoto líquido e recipientes criobiológicos, II Parte- sêmen congelado de bovinos. Maneio e aplicação*. Texto de apoio ao Curso de Formação para Médicos Veterinários Directores de Subcentro de Inseminação Artificial. Estação Nacional de Selecção e Reprodução Animal. Venda Nova, 46 pp. (policopiado).
- Chagas e Silva, J. N. (1998). Inseminação artificial em bovinos leiteiros: factores que influenciam a fertilidade. *A Vaca Leiteira*, 68, 31-32.
- Chagas e Silva, J. N. (2007). *Azoto líquido e recipientes criobiológicos, sêmen congelado: maneio e aplicação*. Texto de apoio às aulas práticas da Disciplina de Reprodução e Obstetrícia II, FMV, Lisboa, 6 pp. (policopiado).
- Chastant-Maillard, S. (2006). Is there a future for farmaceutical management in cow reproduction? *European perspective. XXIV World Buiatrics Congress – Nice, France*.
- Chenault, J. R., Boucher, J. F., Dame, K. J., Meyer, J. A. & Wood-Folls, S. L. (2003). Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *American Dairy Science Association*, 86, 2039-2049.
- Cirit, Ü., Ak, K. & Ileri, I. K. (2007). New strategies to improve the efficiency of the ovsynch protocol in primiparous dairy. *Bull of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51, 47-51.
- Costa, A. N. L., Araujo, A. A. & Feitosa, J.V. (2011). Particularities of bovine artificial insemination. In M. Manafi (Ed), *Artificial insemination in farm animals*. (pp. 153-166). Croatia: In Tech.
- Crowe, M. A. (2008). Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reproduction Domestic Animal*, 43 (suppl.5), 20-28.
- Driancourt, M. A. (2000). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55, 1211-1239.
- El-Zarkouny, S. Z., Cartmill, J. A., Hensley, B. A. & Stevenson, J. S. (2004). Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimes with or without presynchronization and progesterone. *Journal of Dairy Science*, 87, 1024-1037.

- Sá Filho, M. F., Crespilho, A. M., Santos, J. E. P., Perry, G. A. & Baruselli, P. S. (2010). Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science*, 120, 23-30.
- Folman, Y., Kaim, M., Herz, Z. & Rosenberg, M. (1990). Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. Effects of progesterone and parity on conception. *Journal of Dairy Science*, 73, 2817-2825.
- Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F. & Roche, M. A. (2011). Oestrous cycles in *Bos Taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 163-169.
- Fricke, P. M., Guenther, J. N. & Wiltbank, M. C. (1998). Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and time AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 50, 1275-1284.
- Geary, T. W. & Whittier, J. C. (1998). Effects of a timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or Co-synch protocol in beef cows. *The Professional Animal Scientist*, 14, 217-220.
- Ginther, O. J., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Gibbons, J. R., Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 55, 1187-1194.
- Ginther, O. J., Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Donadeu, F. X. & Kot, K. (2001a). Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction*, 65, 638-647.
- Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Beg, M. A. & Kot, K. (2001b). Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, 64, 197-205.
- Gordon, I. (1996a). The cow's oestrous cycle and associated events. In I. Gordon, *Reproduction in cattle & buffaloes: controlled reproduction in farm animals series, volume 1*. (pp. 100-132). USA: CAB International.
- Gordon, I. (1996b). Introduction to controlled reproduction in cattle. In I. Gordon, *Reproduction in cattle & buffaloes: controlled reproduction in farm animals series, volume 1*. (pp. 1-99). USA: CAB International.
- Gordon, I. (1996c). Artificial control of oestrus and ovulation. In I. Gordon, *Reproduction in cattle & buffaloes: controlled reproduction in farm animals series, volume 1*. (pp. 133-166). USA: CAB International.
- Gordon, I. (2004a). Controlling oestrus and ovulation. In I. Gordon, *Reproduction technologies in farm animals*. (pp. 140-163). USA: GABI Publishing.
- Gordon, I. (2004b). Artificial insemination. In I. Gordon, *Reproduction technologies in farm animals*. (pp. 49-81). USA: GABI Publishing.
- Gümen A., Guenther J. N. & Wiltbank M.C. (2003). Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86, 3184-3194.
- Hafez, B. & Hafez, E. S. E. (2004a). Anatomia da reprodução feminina. In B. Hafez & E. S. E. Hafez (Eds), *Reprodução animal*. (7ª edição). (pp. 13-29). Brasil: Manole, Ltda.



- Hafez, E. S. E. & Hafez, B. (2004b). Ciclos reprodutivos. In B. Hafez & E. S. E. Hafez (Eds), *Reprodução animal*. (7ª edição). (pp. 55-67). Brasil: Manole, Ltda.
- Hartigan, O.J. (2008). Fisiologia reprodutiva em bovinos. In A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd & R. G. Eddy (Eds), *Medicina bovina: doenças e criação de bovinos*. (2ª edição). (pp.416-447). São Paulo: Roca.
- Herlihy, M. M., Crowe, M. A., Diskin, M. G. & Butler, S. T. (2012). Effect of synchronization treatments on ovarian follicular dynamics, corpus luteum growth, and circulating steroid hormone concentrations in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*, 95, 743-754.
- Hopkins, S. M (2003). Reproductive patterns of cattle. In M. H. Pineda & M. P. Dooley (Eds). *Mcdonald's veterinary endocrinology and reproduction*. (5th ed.). (pp. 395-412). USA: Iowa State Press.
- Hopkins, S. M. & Evans, L. E. (2003). Artificial insemination. In M. H. Pineda & M. P. Dooley (Eds). *Mcdonald's veterinary endocrinology and reproduction*. (5th ed.). (pp. 341-375). USA: Iowa State Press.
- Ireland, J. J., Mihm, M., Austin, E., Diskin, M. G. & Roche, J. F. (2000). Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *Journal Dairy Science*, 83, 1648-1658.
- Jáinudeen, M. R., Wahid, H. & Hafez, E. S. E. (2004). Indução da ovulação. Produção e transferência de embriões. In B. Hafez & E. S. E. Hafez (Eds), *Reprodução animal*. (7ª edição). (pp. 409-434). Brasil: Manole, Ltda.
- Johnson, S. K. (2005). Possibilities with today's reproductive technologies. *Theriogenology*, 64, 639-656.
- Keith, B. R., Leslie, K. E., Johnson, W. H. & Walton, J. S. (2005). Effect of presynchronization using prostaglandin F<sub>2α</sub> and mull-ejection test on pregnancy rate after the timed artificial insemination protocol, Ovsynch. *Theriogenology*, 63, 722-738.
- König, H.E. & Liebich, H.G. (2002). Órgãos genitais femininos. In H.E. König & H.G. Liebich, *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido, volume 2 – órgãos e sistemas*. (pp. 135-151). Porto Alegre: Artmed® Editora S.A.
- Lane, E. A., Austin, E. J. & Crowe, M. A. (2008). Oestrous synchronization in cattle – Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Animal Reproductive Science*, 109, 1-16.
- López-Gatius, F. (1999). Site of semen deposition in cattle: a review. *Theriogenology*, 53, 1407-1414.
- Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle. Where will it end? *Journal Dairy Science*, 84, 1277-1293.
- Lucy, M. C., McDougall, S. & Nation, D. P. (2004). The use of hormonal treatments to improve the reproduction performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Animal Reproductive Science*, 82-83, 495-512.

- Lucy, M. C. (2007). The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of Animal Science*, 85, 89-99.
- Moreia, F., Orlandi, C., Risco, C. A., Mattos, R., Lopes, F. & Thatcher, W. W. (2001). Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84, 1646-1659.
- Morrell, J. M. (2011). Artificial insemination: current and future trends. In M. Manafi (Ed), *Artificial insemination in farm animals*. (pp. 1-14). Croatia: In Tech.
- Navanukraw, C., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., Kirsch, J. D., Grazul-Bilska, A. T. & Fricke, P. M. (2004). A modified presynchronization protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 1551-1557.
- Nebel, R. L., Walker, W. L. & McGilliard, M. L. (1994). Timing of artificial insemination of dairy cows: fixed time one daily versus morning and afternoon. *Journal of Dairy Science*, 77, 3185-3191.
- Nebel, R. L. (2007). Techniques for artificial insemination of cattle with frozen-thawed semen. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology*. (2nd ed.). (pp. 253-258). ST.Louis Missouri: Saunders Elsevier.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G. C. W. (2001a). Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. In D.E.Noakes, T.J.Parkinson & G. C. W. England (Eds), *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. (8th ed). (pp. 3-53). London: Saunders.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G. C. W. (2001b). The puerperium and care of the newborn. In D.E.Noakes, T.J.Parkinson & G. C. W. England (Eds), *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. (8th ed). (pp. 189-202). London: Saunders.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G. C. W. (2001c). Artificial insemination. In D.E.Noakes, T.J.Parkinson & G. C. W. England (Eds), *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. (8th ed). (pp. 751-778). USA: London: Saunders.
- O'Connor, M. L. (2007). Estrus detection. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology*. (2nd ed.). (pp. 270-278). USA: Saunders Elsevier.
- Öztürk, Ö. A., Cirit, Ü., Baran, A. & Ak, k. (2010). Is Doublesynch protocol a new alternative for timed artificial insemination in anestrus dairy cows. *Theriogenology*, 73, 568-576.
- Pansani, M. A. & Beltran, M. P. (2009). Anatomia e fisiologia do aparelho reprodutor de fêmeas bovinas. *Revista Eletrônica de Medicina Veterinária*, 12, 1-5.
- Parker, R. & Mathis, C. (2002). *Reproductive tract anatomy and physiology of the cow*. Acedido em Maio, 18, 2013, disponível em : [http://aces.nmsu.edu/pubs/\\_b/b-212.pdf](http://aces.nmsu.edu/pubs/_b/b-212.pdf).
- Peter, A. T., Levine, H., Drost, M. & Bergfelt, D. R. (2009). Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*, 71, 1343-1357.

- Peters, A. R., Mawhinney, I., Drew, S. B., Ward, S. J., Warren, M. J. & Gordon, P. J. (1999). Development of a gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin regimen of the planned breeding of dairy cows. *The Veterinary Record*, 145 (18), 516-521.
- Peters, M. W. & Pursley, J. R. (2003). Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulation follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology*, 60, 1197-1204.
- Portaluppi, M. A. & Stevenson, S. (2005). Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycle and variations of the protocol. *Journal of Dairy Science*, 88, 914-921.
- Prange, R. W. & Duby, R. T. (sem data). *Anatomy of the cow's reproductive tract*. Acedido em Maio, 18, 2013, disponível em: <http://www.wvu.edu/~agexten/forglvst/Dairy/dirm1.pdf>.
- Pursley, J. R., Me, M. O. & Wiltbank, M. C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2α</sub> and GnRH. *Theriogenology*, 44, 915-923.
- Pursley, J. R., Kosorok, M. R. & Wiltbank, M. C. (1997a). Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *Journal of Dairy Science*, 80, 301-306.
- Pursley, J. R., Wiltbank, M. C., Stevenson, J. S., Ottobre, J. J., Garverick, H. A. & Anderson, L. L. (1997b). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science*, 80, 295-300.
- Pursley, J. R., Silcox, R. W. & Wiltbank, W. C. (1998). Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 2139-2144.
- Pursley, S. R. & Bello, N. M. (2007). Ovulation synchronization strategies in dairy cattle using PGF<sub>2α</sub> and GnRH. In R. S. Youngquist & W. R. Trelfall, *Current therapy in large animal theriogenology*. (2nd ed.). (pp.286-293). St. Louis Missouri: Saunders Elsevier.
- Rabiee, A. R., Lean, I. J. & Stevenson, M. A. (2005). Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 88, 2754-2770.
- Santos, J. E. P., Galvão, K. N., Ronaldo, L. A., Cerri, R. C. & Juchem, S. O. (2003). Controlled breeding programs for reproductive management. *Advances in Dairy Technology*, 15, 49-68.
- Senger P. L. (2003a). Reproductive cyclicity- terminology and basic concepts. In P. L. Senger, *Pathways to pregnancy and parturition*. (2 nd ed.). (pp. 144-163). USA: Current Conceptions, Inc.
- Senger P. L. (2003b). Reproductive cyclicity- the follicular phase. In P. L. Senger, *Pathways to pregnancy and parturition*. (2 nd ed.). (pp. 164-187). USA: Current Conceptions, Inc.

- Senger P. L. (2003c). Reproductive cyclicity- the luteal phase. In P. L. Senger, *Pathways to pregnancy and parturition*. (2 nd ed.). (pp. 188-213). USA: Current Conceptions, Inc.
- Sheldon, I. M., Barrett, D. C., & Body, H. (2008). Período pós-parto. In A. R. Andrews, R. W. Blowey, H. Body & R. G. Eddy (Eds), *Medicina Bovina: Doenças e criação de bovinos*. (2ª edição). (p.448-466). São Paulo: Roca.
- Shirasuma, K., Nitta, A., Sineenard, J., Shimizu, T., Bollewein, H. & Miyamoto, A. (2012). Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domestic Animal Endocrinology*, 43, 198-211.
- Silva, A. S. L., Teixeira, P. P. M. & Vicente, W. R. R. (2010). Mecanismos fisiológicos e bioquímicos da luteólise: revisão de literatura. Acedido em junho, 10, 2013, disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria15/revisao/ANOIIIIEDI15RL04.pdf>.
- Sisson, S. (1986). Aparelho urogenital. In R. Getty, *Sisson e Grossman anatomia dos animais domésticos, volume 1*. (5ª edição). (pp. 887-895). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Sousa Guerra, F. J. T. (1978). *O que o inseminador deve saber*. Manual de curso de IA. Estação Nacional de Seleção e Reprodução Animal. Venda Nova (Amadora), 99 pp. (policopiado).
- Stevenson J. S., Smith J. F. & Hawkins D. E. (2000). Reproductive outcomes of dairy heifers treated with combinations of prostaglandin F<sub>2α</sub>, norgestomet, and gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Dairy Science*, 83, 1-8.
- Stevenson, J. S. (2001). Synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *Advances Dairy Technology*, 13, 379-392.
- Stevenson, J. S. (2005). Breeding strategies to optimize reproduction efficiency dairy herds. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 21, 349-365.
- Stevenson, J. S., Pursley, J. R., Garverick, H. A., Fricke, P. M., Kesler, D. J. Ottobre, J. S. & Wiltank, M. C. (2006). Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during ovsynch. *Journal of Dairy Science*, 87, 2567-2578.
- Stevenson, J. S. (2007). Clinical reproductive physiology of the cow. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology*. (2nd ed.). (pp. 258-270). ST.Louis Missouri: Saunders Elsevier.
- Stötzel, C., Plöntzke, J., Heuwieser, W. & Röblitz, S. (2012). Advances in modeling of the bovine estrous cycle: synchronization with PGF<sub>2α</sub>. *Theriogenology*, 78, 1415-1428.
- Tanaka, T., Arai, M., Ohtani, S., Uemura, S., Kuroiwa, T., Kim, S. & Kamomae, H. (2008). Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 108, 134-143.
- Tenhagen, B., Vogel, C., Drillich, M., Thiele, G. & Heuwieser, W. (2003). Influence of stage of lactation and milk production on conception rates after timed artificial insemination following Ovsynch. *Theriogenology*, 60, 1527-1537.
- Thatcher, W. W., Bilby, T. R., Bartolome, J. A., Silvestre, F., Staples, C. R. & Santos, J. E. (2006). Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*, 65, 30-34.

- Trimberg, G. W. & Davies, H. P. (1943). Breeding efficiency in dairy cattle bred at various stages of estrus by artificial insemination. *Journal of Dairy Science*, 26, 757-759.
- Vasconcelos, J. L. M., Silcox, R. W., Rosa, G. J. M., Pursley, J. R. & Wiltbank, M. C. (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52, 1067-1078.
- Webb, R. & Armstrong, D. G. (1998). Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science*, 53, 95-112.
- Whisnant, C. S., Washburn, S. P. & Farin, P. W. (1999). Current concepts in synchronization of estrus and ovulation of dairy cows. *American Society of Animal Science*, 1-8 pp.
- Wichtel, J., LeBlanc, S. & DesCôteaux, L. (2004). Synchronized breeding programs in canadian dairy herds: attitudes and opportunities. *Large Animal Veterinary*, 4 (5), 1-6.
- Wiltbank, K. M., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S. & Gümen, A. (2006). Changes in reproduction physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65, 17-29.
- Wiltbank, M. C., Sartori, R., Herlihy, M. M., Vasconcelos, J. L. M., Nascimento, A. B., Souza, A. H., Ayres, H., Cunha, A. P., Keskin, A., Guenther, J. N. & Gümen, A. (2011). Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 76, 1568-1582.

## ANEXOS

Tabela 9. Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos estatísticos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados. Grupo controlo negativo – cio espontâneo.

Nº de casa	Idade	Nº Partos	Intervalo Parto-Inseminação (dias)	Data da 1ª IA	Touro	DG da 1ª IA (30 dias)	DG da 1ª IA (50 dias)	Data da 2ª IA	DG da 2ª IA (50 dias)	Produção de leite do contraste no mês da 1ª IA (L)
981	4	1	47	04-01-2013	Top-red	Retorno	—	24-01-2013	Negativo	36,8
91	7	4	46	23-01-2013	Top-red	Retorno	—	21-02-2013	Positivo	64,4
56	3	1	48	15-02-2013	Martonvasar	Retorno	—	08-03-2013	Positivo	29,4
876	5	3	73	27-03-2013	Baltar	Positivo	Positivo	—	—	48,2
94	3	1	40	09-04-2013	Cisco	Negativo	Negativo	15-05-2013	Positivo	33
81	3	1	41	26-04-2013	Showdowe	Positivo	Positivo	—	—	33,8
845	5	3	107	26-04-2013	Showdowe	Positivo	Positivo	—	—	34,6
947	4	2	43	26-04-2013	Showdowe	Retorno	—	18-05-2013	Retorno	43,2
850	5	3	42	23-05-2013	Xbox	Retorno	—	15-06-2013	Positivo	37,6
1131	2	1	35	26-05-2013	Xbox	Negativo	Negativo	—	—	32,4
85	2	1	55	07-06-2013	São Pedro	Retorno	—	28-06-2013	Negativo	38,6
112	2	1	44	07-06-2013	Xbox	Retorno	—	29-06-2013	Negativo	40
930	4	2	42	15-06-2013	Xbox	Positivo	Positivo	—	—	37,8

Tabela 10. Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos estatísticos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados. Grupo controlo positivo- PGF<sub>2α</sub>.

Nº de casa	Idade	Nº Partos	Intervalo Parto-Inseminação (dias)	Data da 1ª IA	Touro	DG da 1ª IA (30 dias)	DG da 1ª IA (50 dias)	Data da 2ª IA	DG da 2ª IA (50 dias)	Produção de leite do contraste no mês da 1ªIA (L)
64	3	1	86	08-01-2013	Top-red	Retorno	—	29-01-2013	Positivo	27,4
824	5	3	74	05-02-2013	Wyman	Negativo	Negativo	08-03-2013	Negativo	46
66	3	1	91	24-02-2013	Climbi	Negativo	Negativo	11-04-2013	Retorno	36,6
764	6	4	63	18-03-2013	Baltar	Negativo	Negativo	22-04-2013	Positivo	41,1
82	3	1	43	18-03-2013	Baltar	Retorno	—	16-04-2013	Positivo	30
70	3	1	55	18-03-2013	Baltar	Positivo	Positivo	—	—	31,6
68	3	1	93	14-04-2013	Trupert	Positivo	Positivo	—	—	32
53	3	1	46	14-04-2013	Bohdan	Positivo	Positivo	—	—	29,2
875	5	3	55	30-04-2013	Showdowe	Positivo	Positivo	—	—	42
743	6	4	49	30-04-2013	Showdowe	Positivo	Positivo	—	—	45,4
10	3	2	48	06-05-2013	Martonvasar	Positivo	Positivo	—	—	29
1136	2	1	46	12-05-2013	São Pedro	Retorno	—	07-06-2013	Positivo	26
1128	2	1	66	12-05-2013	São Pedro	Retorno	—	02-06-2013	Positivo	28,5
93A	3	1	89	02-06-2013	Xbox	Retorno	—	22-06-2013	Negativo	28,8
990	4	2	48	13-06-2013	São Pedro	Retorno	—	05-07-2013	Negativo	43,4

Tabela 11. Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos estatísticos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados. Grupo Ovsynch.

Nº de casa	Idade	Nº Partos	Intervalo Parto-Inseminação (dias)	Data da 1ª IA	Touro	DG da 1ª IA (30 dias)	DG da 1ª IA (50 dias)	Data da 2ª IA	DG da 2ª IA (50 dias)	Produção de leite do contraste no mês da 1ª IA (L)
71A	3	1	61	17-01-2013	Lyneu	Negativo	Negativo	18-03-2013	Negativo	34,8
838	5	3	59	17-01-2013	Lyneu	Retorno	—	05-02-2013	Negativo	46
35A	3	1	68	17-01-2013	Lyneu	Retorno	—	07-02-2013	Negativo	29,4
73	3	1	55	31-01-2013	Lyneu	Retorno	—	20-02-2013	Positivo	30
39	3	1	61	31-01-2013	Lyneu	Retorno	—	21-02-2013	Positivo	38,1
22	3	1	44	14-02-2013	Martonvasar	Retorno	—	04-03-2013	Retorno	27,6
936	4	2	50	14-02-2013	Wyman	Positivo	Positivo	—	—	39
843	5	3	58	14-02-2013	Wyman	Negativo	Negativo	14-04-2013	Positivo	40
804	5	3	51	14-02-2013	Wyman	Negativo	Negativo	18-04-2013	Retorno	39,2
69	3	1	66	28-03-2013	Cisco	Retorno	—	18-04-2013	Positivo	36,1
59A	3	1	83	28-03-2013	Cisco	Negativo	Negativo	14-05-2013	Negativo	43,6
62	3	1	52	25-04-2013	Showdowe	Retorno	—	15-05-2013	Positivo	28
5	3	1	71	25-04-2013	Showdowe	Negativo	Negativo	07-06-2013	Positivo	25,1
1130	2	1	75	25-04-2013	Showdowe	Negativo	Negativo	—	—	25,7
88	3	1	82	09-05-2013	Martonvasar	Positivo	Positivo	—	—	29



Tabela 12. Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos estatísticos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados. Grupo Doublesynch.

Nº de casa	Idade	Nº Partos	Intervalo Parto-Inseminação (dias)	Data da 1ª IA	Touro	DG da 1ª IA (30 dias)	DG da 1ª IA (50 dias)	Data da 2ª IA	DG da 2ª IA (50 dias)	Produção de leite do contraste no mês da 1ª IA (L)
928	4	2	48	17-01-2013	Lyneu	Negativo	Negativo	04-03-2013	Positivo	39,2
921	4	2	53	17-01-2013	Lyneu	Retorno	—	08-02-2013	Negativo	38,7
885	5	2	92	31-01-2013	Lyneu	Negativo	Negativo	12-03-2013	Negativo	32,8
816	5	3	68	31-01-2013	Lyneu	Negativo	Negativo	22-03-2013	Positivo	38,6
58	3	1	85	31-01-2013	Lyneu	Retorno	—	20-02-2013	Negativo	29,2
879	5	2	66	31-01-2013	Lyneu	Negativo	Negativo	03-04-2013	Positivo	33
810	5	3	72	31-01-2013	Lyneu	Retorno	—	21-02-2013	Negativo	38,5
760	6	3	58	11-04-2013	Cisco	Retorno	—	29-04-2013	Retorno	32,6
912	4	2	78	11-04-2013	Cisco	Positivo	Positivo	—	—	44
63	3	1	81	11-04-2013	Cisco	Negativo	Negativo	15-06-2013	Negativo	29
766	6	3	55	11-04-2013	Cisco	Negativo	Negativo	17-06-2013	Positivo	32
770	6	4	73	25-04-2013	Showdowe	Retorno	—	07-05-2013	Positivo	38,7
60	3	1	48	25-04-2013	Showdowe	Negativo	Negativo	20-06-2013	Negativo	34
1129	2	1	57	25-04-2013	Showdowe	Positivo	Positivo	—	—	21,4
920	4	2	75	09-05-2013	São Pedro	Positivo	Positivo	—	—	40